



Universitat Autònoma de Barcelona

ESCOLA D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**DESENVOLUPAMENT I ANÀLISI D'UN BIOPROCÉS
PER A L'OBTENCIÓ DE VECTORS ADENOVIRALS
PER A TERÀPIA GÈNICA**

Memòria que per optar al grau de
Doctor per la UAB, programa de
doctorat Biotecnologia, presenta:

JORDI GÁLVEZ SÁNCHEZ

Bellaterra, juny de 2010

FRANCESC GÒDIA i CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JORDI JOAN CAIRÓ i BADILLO, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat Jordi Gálvez Sánchez ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol de: **Desenvolupament i anàlisi d'un bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals per a teràpia gènica**, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Biotecnologia.

I perquè en prenguem coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, maig de 2010

Francesc Gòdia i Casablanca

Jordi Joan Cairó i Badillo

(...)

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino
sino estelas en la mar...*
(...)

Antonio Machado

AGRADECIMIENTOS

Me resulta muy extraño.

Creedme, al principio todo parece una quimera, pero después de este largo camino, me resulta muy extraño estar escribiendo hoy estos párrafos. Supongo que se debe a que en un espacio relativamente reducido, he de hacer partícipe a todo aquél que consulte, lea, hojee o, incluso, critique constructivamente (o no) este documento, del profundo agradecimiento que siento por una serie de personas, sin la ayuda de las cuales jamás podría haber finalizado esta etapa de mi vida con éxito.

Es por esta razón por la que en primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento y respeto por mis dos directores de tesis, Francesc Gòdia y Jordi Joan Cairó. La apuesta que hace ya seis años hicisteis por recuperarme y brindarme la oportunidad de adquirir estos nuevos conocimientos ha sido determinante en mi vida tanto para mi desarrollo intelectual como personal. Espero no haberos defraudado.

En el plano científico, aún me gustaría agradecer a dos personas su inestimable aportación a este trabajo. Por una parte a Miguel Chillón, jefe de la Unitat Productora de Vectors del CBATEG, por aportar los protagonistas biológicos indispensables de esta “odisea”, pero especialmente quisiera hacer mención a Mercedes Segura. A pesar de lo relativamente poco que nos conocemos, estoy totalmente convencido de que gran parte de este trabajo no hubiera sido posible sin tu valiosa ayuda, consejos y aportaciones. Éstos lo han enriquecido de una manera que ni yo mismo podría haber sospechado en un principio. Gracias una vez más por tu esfuerzo, dedicación y guía.

No quiero olvidar tampoco al resto de grupo de “Mabs-GECiT”, a los que continúan y a los que conocí durante estos años, hemos sido muchos y compartido demasiadas cosas como para no mencionarlos. En este sentido, quiero citar expresamente a una persona que no forma parte de nuestro grupo de manera oficial, pero que para mí es como si la hiciera desde siempre, Rosi Tello. Tengo la inmensa suerte de contar con tu amistad y cariño casi filial; quiero que sepas que si algún día dejo la UAB, tú serás la persona a quien más echaré de menos.

Finalmente, sería un ingenuo si creyera que este trabajo es fruto únicamente de una serie de circunstancias y personas de la esfera universitaria y/o científica.

En algún lugar leí que para saber realmente quién eres, has de primero saber de dónde vienes. Después de este periodo de mi vida, yo tengo muy claro quién soy, porque sé de dónde vengo y a quiénes se lo debo todo: a José y Micaela, mis padres. Recuerdo perfectamente el día en que os anuncié que quería dar un nuevo rumbo a mi vida, decidía dejar de caminar en una dirección y dirigirme hacia otra totalmente opuesta. Contrariamente a lo que se pudiera esperar, lo único que obtuve de vosotros fue un apoyo inquebrantable y una confianza ciega en mis posibilidades. No existen palabras en ningún idioma para expresar mi agradecimiento, mi respeto y mi amor hacia vosotros.

ÍNDEX

NOMENCLATURA.....	vii
1. RESUM	1
2. INTRODUCCIÓ.....	5
2.1. Teràpia Gènica	8
2.1.1. Antecedents històrics.....	10
2.1.2. Aplicacions.....	12
2.2. Vectors per a teràpia gènica	14
2.2.1. Tipus de vectors	14
2.2.1.1. Vectors no virals.....	15
2.2.1.2. Vectors virals.....	17
2.3. Vectors adenovirals	22
2.3.1. Estructura del virió	22
2.3.1.1. Càpside	23
2.3.1.2. Genoma	24
2.3.2. Cicle infectiu	24
2.3.3. Disseny dels vectors adenovirals	26
2.3.3.1. Vectors adenovirals de primera generació	27
2.3.3.2. Vectors adenovirals de segona generació.....	27
2.3.3.3. Vectors adenovirals de tercera generació	27
2.4. Línies cel·lulars productores de vectors adenovirals.....	28
2.4.1. Línies cel·lulars adherents.....	28
2.4.2. Línies cel·lulars no adherents.....	30
2.5. Bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals.....	31
2.5.1. Producció.....	31
2.5.1.1. Producció no adherent o en suspensió.....	33
2.5.1.2. Producció adherent.....	35
2.5.2. Purificació	39
2.5.2.1. Estratègia no escalable	39
2.5.2.2. Estratègia escalable	40
2.6. Normativa del bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals	41
2.6.1. Bones pràctiques de manufactura (GMP)	41
2.6.2. Tecnologia de bioprocés d'un sol ús.....	42
2.6.2.1. Producció.....	42
2.6.2.2. Purificació	44
2.7. Bibliografia.....	45
3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	51
4. ESTUDIS PREVIS	53
4.1. Caracterització de la línia cel·lular productora	54
4.1.1. Línia cel·lular adherent	54
4.1.1.1. Medi de cultiu.....	54

4.1.1.2. Sistema de cultiu no agitat	55
4.1.1.3. Sistema de cultiu agitat: cultiu sobre microsuports.....	59
4.1.2. Línia cel·lular no adherent	74
4.1.2.1. Medis de cultiu	75
4.1.2.2. Sistema de cultiu agitat: procés d'adaptació a suspensió.....	76
4.2. Caracterització del procés d'infecció adenoviral	80
4.2.1. Temps d'infecció (concentració d'infecció)	81
4.2.2. Temps d'alimentació	82
4.2.3. Temps de recollida	82
4.2.4. Multiplicitat d'infecció.....	83
4.2.4.1. Infecció de la línia cel·lular adherent.....	84
4.2.4.2. Infecció de la línia cel·lular no adherent.....	89
4.2.5. Comparació d'infectivitat: línia cel·lular productora	90
4.3. Bibliografia.....	92
5. PRODUCCIÓ	97
5.1. Monitoratge de producció	98
5.1.1. Velocitat de consum d'oxigen.....	100
5.2. Estratègia de producció	105
5.2.1. Producció en discontinu	106
5.2.2. Producció en discontinu alimentat	108
5.2.3. Producció en continu.....	108
5.2.3.1. Perfusió.....	109
5.2.3.2. Dues etapes.....	109
5.3. Sistema de producció: bioreactor	110
5.4. Sistema convencional.....	111
5.4.1. Programari de control de procés.....	111
5.4.1.1. Descripció.....	112
5.4.1.2. Receptes	113
5.4.1.3. Recepta per a la determinació de la constant de desorció (K_{des}).....	114
5.4.2. Producció en discontinu	118
5.4.2.1. Descripció de la producció en discontinu	118
5.4.2.2. Caracterització de la producció en discontinu.....	120
5.4.2.3. Determinació dels paràmetres cinètics i estequiomètrics.....	128
5.4.3. Producció en continu amb perfusió.....	131
5.4.3.1. Descripció de la producció en continu amb perfusió	131
5.4.3.2. Caracterització de la producció en continu amb perfusió	137
5.4.3.3. Determinació dels paràmetres cinètics i estequiomètrics.....	154
5.5. Sistema no convencional.....	157
5.5.1. Producció en discontinu	163
5.5.1.1. Descripció de la producció en discontinu	163
5.5.1.2. Caracterització de la producció en discontinu.....	165

5.5.2. Producció en continu amb perfusió.....	172
5.5.2.1. Descripció de la producció en continu amb perfusió.....	172
5.5.2.2. Caracterització de la producció en continu amb perfusió.....	175
5.6. Comparació dels sistemes de producció.....	183
5.7. Bibliografia.....	186
6. PURIFICACIÓ.....	195
6.1. Propietats del brou de cultiu.....	196
6.2. Propietats fisicoquímiques de l'adenovirus.....	196
6.3. Estratègies de purificació.....	197
6.4. Estratègia no escalable.....	200
6.4.1. Recollida.....	201
6.4.2. Lisi cel·lular.....	201
6.4.3. Clarificació.....	202
6.4.4. Captura.....	202
6.4.5. Polit.....	205
6.4.6. Taula de purificació.....	206
6.5. Estratègia escalable.....	208
6.5.1. Recollida.....	211
6.5.2. Lisi cel·lular.....	211
6.5.3. Clarificació.....	211
6.5.4. Concentració.....	216
6.5.4.1. Estudi d'escalabilitat.....	217
6.5.5. Tractament d'àcids nucleics.....	220
6.5.6. Condicionament.....	224
6.5.7. Captura.....	226
6.5.7.1. Desenvolupament de la tècnica.....	229
6.5.7.2. Aplicació de la tècnica.....	245
6.5.8. Segona concentració.....	251
6.5.9. Polit.....	252
6.5.9.1. Aplicació de la tècnica.....	255
6.5.10. Taula de purificació.....	258
6.6. Comparació d'estratègies.....	260
6.7. Caracterització final del vector: puresa.....	261
6.7.1. Anàlisi de proteïnes.....	261
6.7.2. Microscòpia electrònica de transmissió.....	265
6.7.2.1. Estratègia de purificació escalable.....	265
6.7.2.2. Estratègia de purificació no escalable.....	268
6.8. Bibliografia.....	270
7. ANÀLISI DE PROCÉS.....	275
7.1. Bases de disseny.....	276
7.2. Descripció del bioprocés.....	276

7.2.1. Bioprocés convencional	277
7.2.1.1. Estratègia en discontinu	277
7.2.1.2. Estratègia en continu amb perfusió	283
7.2.2. Bioprocés no convencional	288
7.2.2.1. Estratègia en discontinu	288
7.2.2.2. Estratègia en continu amb perfusió	293
7.3. Avaluació econòmica	298
7.3.1. Costos	299
7.3.1.1. Costos d'inversió	299
7.3.1.2. Costos d'operació	302
7.3.2. Ingressos	304
7.3.3. Anàlisi de rendibilitat	304
7.3.4. Comparació de les alternatives	305
7.4. Bibliografia	311
8. CONCLUSIONS I TREBALL FUTUR	313
9. MATERIALS I MÈTODES	317
9.1. Vector adenoviral	317
9.2. Línia cel·lular	317
9.2.1. Línia cel·lular adherent	317
9.2.2. Línia cel·lular no adherent	317
9.3. Medis de cultiu	317
9.3.1. Medis de cultiu en adherència	317
9.3.2. Medis de cultiu no adherent: medis lliures de sèrum	318
9.3.3. Solucions estoc per suplementar els medis de cultiu	319
9.3.3.1. Sèrum Fetal Boví (FBS)	319
9.3.3.2. F-68 Pluronic	319
9.3.3.3. Antiescumejant	320
9.3.3.4. GlutaMAX	320
9.4. Manteniment de la línia cel·lular	320
9.4.1. Congelació	320
9.4.2. Descongelació	321
9.4.3. Manteniment del cultiu: subcultiu	322
9.4.3.1. Cultiu no adherent	322
9.4.3.2. Cultiu adherent	323
9.4.4. Control d'esterilitat	323
9.5. Producció	324
9.5.1. Bioreacció: sistemes convencionals	324
9.5.1.1. Flascons de cultiu	324
9.5.1.2. Flascons de cultiu agitats	324
9.5.1.3. Bioreactor de tanc agitat: Biostat Bplus	325
9.5.1.4. Equipament associat al bioreactor	327

9.5.1.5. Equipament per al tractament de dades.....	331
9.5.1.6. Protocols operacionals en el bioreactor convencional	331
9.5.2. Bioreacció: sistema no convencional	337
9.5.2.1. Bioreactor d'un sol ús: <i>Wave Bioreactor System20/50EHT</i>	337
9.5.2.2. Equipament associat al bioreactor.....	338
9.5.2.3. Equipament per al tractament de dades.....	341
9.5.2.4. Protocols operacionals en el bioreactor no convencional	341
9.6. Purificació	345
9.6.1. Microfiltració	345
9.6.1.1. Mòdul de microfiltració	345
9.6.1.2. Unitat de bombeig	345
9.6.1.3. Protocol operacional.....	345
9.6.2. Ultrafiltració / Diafiltració	346
9.6.2.1. Midjet Advanced	346
9.6.2.2. Quixstand	347
9.6.2.3. Equipament associat.....	347
9.6.2.4. Protocol operacional.....	348
9.6.3. Tractament d'àcids nucleics	349
9.6.3.1. Protocol operacional.....	349
9.6.4. Cromatografia.....	349
9.6.4.1. Cromatògraf FPLC	349
9.6.4.2. Equipament associat al cromatògraf FPLC	350
9.6.4.3. Equipament per al tractament de dades.....	353
9.6.4.4. Protocol operacional.....	354
9.6.5. Ultracentrifugació.....	354
9.6.5.1. Ultracentrífuga	354
9.6.5.2. Equipament associat a la ultracentrífuga.....	354
9.6.5.3. Protocol operacional.....	355
9.7. Mètodes analítics.....	356
9.7.1. Anàlisi de la concentració cel·lular: recompte.....	356
9.7.1.1. Recompte cel·lular amb blau de tripà	356
9.7.1.2. Recompte cel·lular per extrusió nuclear.....	357
9.7.2. Anàlisi de la concentració vírica	358
9.7.2.1. Concentració infectiva per citometria de flux	358
9.7.2.2. Concentració física per microscòpia electrònica.....	359
9.7.2.3. Concentració física per espectrofotometria.....	359
9.7.3. Anàlisi de la concentració de substrats i subproductes	360
9.7.3.1. Concentració de glucosa i lactat.....	360
9.7.4. Anàlisi d'àcids nucleics (DNA)	360
9.7.4.1. Determinació quantitativa	360
9.7.4.2. Electroforesi en gel d'agarosa	360

9.7.5. Anàlisi de proteïnes	361
9.7.5.1. Determinació quantitativa	361
9.7.5.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	362
9.7.5.3. Assaig immunològic (Western Blot)	363
9.7.6. Microscòpia electrònica	364
9.7.6.1. Observació per tinció negativa	364
9.8. Bibliografia	366
10. APÈNDIX	367
10.1. Informes de les receptes de control	367
10.1.1. Recepta KDES	367
10.1.1.1. Operacions	367
10.1.1.2. Fases	368
10.1.2. Recepta PERF	370
10.1.2.1. Operacions	370
10.1.2.2. Fases	371
10.1.3. Variables i constants	374
10.1.4. Fórmules	379
10.2. Informes d'avaluació econòmica	389
10.2.1. Bioprocés convencional: estratègia en discontinu	389
10.2.2. Bioprocés convencional: estratègia en continu amb perfusió	393
10.2.3. Bioprocés no convencional: estratègia en discontinu	397
10.2.4. Bioprocés no convencional: estratègia en continu amb perfusió	401

NOMENCLATURA

NOMENCLATURA

Abreviatura	Descripció
A_{260}	Mesura d'absorbància a 260 nm
A_{280}	Mesura d'absorbància a 280 nm
A549	Cèl·lules de carcinoma alveolar humà
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
A_{col}	Àrea transversal interna de la columna de cromatografia (cm^2)
Ad	Adenovirus
Ad5	Adenovirus serotipus 5
ADA	Adenosina Desaminasa
ADP	<i>Adenovirus Death Protein</i>
AEXC	<i>Anion Exchange Chromatography</i>
AFM	<i>Association Française contre les Myopathies</i>
B	Valor promig de cèl·lules per perla de microsuport
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Concentració (g/mL)
$C_{O_2}^*$	Concentració d'oxigen dissolt en equilibri amb la fase gas (mM)
$C_{O_2}(t)$	Concentració d'oxigen dissolt en qualsevol temps (mM)
C_R	Concentració de solut al retingut durant la diafiltració (mM)
C_0	Concentració de solut a l'aliment durant la diafiltració (mM)
C_1	Concentració de cèl·lules viables del cultiu exhaurit (cell/mL)
C_2	Concentració de cèl·lules viables del nou subcultiu (cell/mL)
CAR	<i>Coxsackie Adenovirus Receptor</i>
cell/mL	cèl·lules viables/mL
CER	Velocitat de producció de CO_2 (mM/h)
CIP	<i>Cleaning In Place</i>
CMO	<i>Contract Manufacturing Organization</i>
CMV	Citomegalovirus
CV	<i>Column Volumes</i>
D_{col}	Diàmetre intern de la columna de cromatografia (cm)
D_{fb}	Diàmetre intern de la fibra (mm)
DCU	<i>Digital Control Unit</i>
DEAE	Reïna cromatogràfica amb lligand de Dietilaminoetil
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>

Abreviatura	Descripció
F	Freqüència de microsuports amb un cert nombre cèl·lules per perla
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FD	Factor de Dilució
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOAM	Variable del control d'escumes a la DCU del Biostat Bplus
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GASFLOW	Variable de control de l'oxigen dissolt a la DCU del Biostat Bplus (%)
GC	Consum de glucosa acumulada (mM)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gluc	Concentració de glucosa al bioreactor (mM)
Gluc_F	Concentració de glucosa en el medi d'alimentació (mM)
Gluc_{sp}	Concentració residual de glucosa en el bioreactor (mM)
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
H	Constant de la llei de Henry (mM)
HEK293	Cèl·lules de <i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HEK293S	Cèl·lules de <i>Human Embryonic Kidney 293 Suspension</i>
HeLaS3	Cèl·lules extretes d'un tumor del coll de l'úter d'Henrietta Lacks S3
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICV	Integral de cèl·lules viables (cell·h/mL)
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>
j	Nombre de cèl·lules per perla de microsuport
JTEMP	Variable del control de temperatura de la camisa termostatada a la DCU del Biostat Bplus
K_{av}	Coefficient de partició
K_{des}	Coefficient volumètric de desorció de l'oxigen en el medi de cultiu (h ⁻¹)
k_{La}	Coefficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen (h ⁻¹)
L_{fb}	Longitud d'una fibra del mòdul de microfiltració (cm)
LEVEL	Variable del control de nivell a la DCU del Biostat Bplus
LMH	$L/(m_{membrana}^2 \cdot h)$
LP	Producció de lactat acumulada (mM)
M_{reïna}	Massa de reïna (g)
M_{S,entrada}	Massa de solut a l'entrada de la columna de cromatografia (g)
M_{S,sortida}	Massa de solut a la sortida de la columna de cromatografia (g)
MFCS/win	<i>Multi Fermenter Control System for Windows</i>
MLP	<i>Major Late Promoter</i>
MM	Milions
MOI	<i>Multiplicity of Infection (UI/cell)</i>

Abreviatura	Descripció
MOPS	Tampó d'àcid 3-(N-morfolino)propanosulfònic
n	Nombre de dades
n_c	Nombre de camps comptats amb l'hemocitòmetre
n₁, n₂	Nombre de cèl·lules en un camp de l'hemocitòmetre
N	Nombre de fibres buides en el mòdul de microfiltració
N_{esferes}	Nombre d'esferes recomptades en una fotografia presa per TEM
N_{inf}	Nombre de cèl·lules viables totals en el moment de la infecció (cell totals)
N_{PV}	Nombre de virions recomptats en una fotografia presa per TEM
N52.E6	Cèl·lules derivades d'amniòcits humans transfectats amb material genètic adenoviral
NCF	<i>Net Cash Flow</i>
NMWC	<i>Nominal Molecular Weight Cut-off</i>
OC	Consum d'oxigen acumulat (mM)
OD	Concentració de l'oxigen dissolt en la fase líquida (%)
OTC	Ornitina Transcarbamilasa
OUR	Velocitat del consum d'oxigen (mM/h)
OUR_i	Velocitat del consum d'oxigen en el temps actual (mM/h)
OUR_{i+1}	Velocitat del consum d'oxigen projectada en el temps següent (mM/h)
\overline{OUR}_i	Velocitat del consum d'oxigen mitjana en un interval de temps (mM/h)
OUR_{màx}	Velocitat de consum d'oxigen màxima (mM/h)
OUR₀	Velocitat del consum d'oxigen en el temps inicial (mM/h)
P	Concentració de producte (mM)
P_{entrada}	Pressió d'entrada (bar)
P_{específica}	Productivitat específica cel·lular (UI/cell)
P_i	Concentració de producte en el temps actual (mM)
P_{i-1}	Concentració de producte en el temps anterior (mM)
\overline{P}_i	Concentració mitjana de producte en un interval de temps (mM)
P_{permeat}	Pressió del permeat durant la filtració (bar)
P_{sortida}	Pressió de sortida durant la filtració (bar)
p/v	Relació entre pes i volum
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Tween</i>
PER.C6	Cèl·lules retinals d'embrió humà
PGK	Fosfoglicerat Quinasa
PhRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufacturers of America</i>
PNT	Procediment Normalitzat de Treball
PO2-GASFLOW	Variable de control de l'oxigen dissolt a la DCU del Biostat Bplus (%)

Abreviatura	Descripció
pO_2	Concentració de l'oxigen dissolt en la fase líquida (%)
$pO_{2,i}$	Concentració de l'oxigen dissolt en la fase líquida (%) en el temps actual
POL	DNA Polimerasa
PV/mL	Partícules víriques físiques/mL
pwm	Pols ample modulats
q_{Gluc}	Velocitat específica de consum de glucosa (nmol/(10^6 cell·h))
q_{Lac}	Velocitat específica de producció de lactat (nmol/(10^6 cell·h))
q_{O_2}	Velocitat específica de consum d'oxigen (nmol/(10^6 cell·h))
q_P	Velocitat específica de producció del producte P (nmol/(10^6 cell·h))
q_S	Velocitat específica de consum del substrat S (nmol/(10^6 cell·h))
Q	Reïna cromatogràfica amb lligand d'amoni quaternari
Q_{add}	Cabal addicionat per la bomba d'alimentació (mL/min)
$Q_{add,i+1}$	Cabal addicionat per la bomba d'alimentació en el temps següent (mL/min)
Q_{fb}	Cabal del líquid que circula a través d'una fibra del mòdul de microfiltració (mL/min)
Q_L	Cabal de flux lineal (velocitat) que circula a través de la columna de cromatografia (cm/min)
Q_{recirc}	Cabal del líquid que circula a través del mòdul de microfiltració (mL/min)
Q_v	Cabal de flux volumètric que circula a través de la columna de cromatografia (mL/min)
r_{fb}	Radi intern d'una fibra buida del mòdul de microfiltració (mm)
R_v	Nombre de recanvis de volum durant la diafiltració
R+D	Recerca i Desenvolupament
RA	Ràtio d'amplificació de la infecció
RCA	<i>Replicative Competent Adenovirus</i>
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
S	Concentració de substrat (mM)
S_F	Concentració de substrat en el medi de cultiu (mM)
S_i	Concentració de substrat en el temps actual (mM)
S_{i-1}	Concentració de substrat en el temps anterior (mM)
\bar{S}_i	Concentració mitjana de substrat en un interval de temps (mM)
SCADA	<i>Supervisory Control and Data Acquisition</i>
SCID-X1	<i>Severe Combined Immunodeficiency – X1</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SFDA	<i>State Food and Drug Administration</i>

Abreviatura	Descripció
SIP	<i>Sterilization In Place</i>
STIRR	Variable de la velocitat d'agitació a la DCU del Biostat Bplus (rpm)
SOUR	Velocitat específica del consum d'oxigen (nmol/(10 ⁶ cell·h))
T	Temperatura (°C)
t	Temps (h)
t _{dupl}	Temps de duplicació (h)
t _f	Temps final (h)
t _{i-1}	Temps anterior (h)
t _i	Temps actual (h)
t _{i+1}	Temps següent (h)
t _{rupt}	Temps de ruptura de la columna de cromatografia (h)
t _{sat}	Temps de saturació de la columna de cromatografia (h)
t ₀	Temps inicial (h)
t _{90%}	Temps de resposta de la sonda òptica d'oxigen dissolt, necessari per arribar al 90% de saturació començant des del 0% d'oxigen dissolt (s)
TAE	Tampó Tris-Acètic-EDTA
TBE	Tampó Tris-Bòric-EDTA
TCA	Cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de Krebs
TEM	Microscòpia electrònica de transmissió
TEMP	Variable de la temperatura a la DCU del Biostat Bplus (°C)
TIR	Taxa Interna de Retorn (%)
[Títol víric] ₀	Concentració vírica infectiva inicial (UI/mL)
[Títol víric] _{final}	Concentració vírica infectiva final (UI/mL)
TMP _{normal}	<i>Transmembrane Pressure</i> amb flux normal (bar)
TMP _{tangencial}	<i>Transmembrane Pressure</i> amb flux tangencial (bar)
TOA	<i>Time of Action</i>
TOF	<i>Time of Feeding</i> (h)
TOH	<i>Time of Harvest</i> (h)
TOI	<i>Time of Infection</i> (h)
TP	<i>Terminal Protein</i>
t-PA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
Tris	Tris[hidroximetil]-aminometà
UA/mL	Unitats d'activitat enzimàtica/mL
UI/mL	Unitats víriques infectives/mL
v/v	Relació entre volums
V	Volum (cm ³)
V _{camp}	Volum de mostra present a cada camp de l'hemocitòmetre (mL)
V _e	Volum d'elució de la columna de cromatografia (mL)
V _{final}	Volum final de mostra (mL)

Abreviatura	Descripció
V_{HF}	Volum intern de les fibres del mòdul de microfiltració (cm^3)
V_R	Volum del bioreactor (mL)
V_{rupt}	Volum de ruptura de la columna de cromatografia (h) (mL)
V_{sat}	Volum de saturació de la columna de cromatografia (h) (mL)
V_t	Volum total de la columna de cromatografia (mL)
V_0	Volum buit de la columna de cromatografia (mL)
V_1	Volum de cultiu exhaurit a centrifugar per realitzar un subcultiu (mL)
V_2	Volum final del subcultiu (mL)
$Vel_{perf,i+1}$	Velocitat de perfusió en el temps següent (h^{-1})
VIH	Virus d'Immunodeficiència Humana
vvm	Volum de gas per volum de líquid per minut
W_{rupt}	Càrrega de ruptura (g solut/g reïna)
W_{sat}	Càrrega de saturació (g solut/g reïna)
$X_{OUR,i}$	Concentració de cèl·lules viables estimada a partir del consum d'oxigen en el temps actual (cell/mL)
$X_{V,inf}$	Concentració de cèl·lules viables en el moment de la infecció (cell/mL)
X_V	Concentració de cèl·lules viables (cell/mL)
$X_{V,0}$	Concentració de cèl·lules viables en el temps d'inoculació (cell/mL)
$X_{V,i}$	Concentració de cèl·lules viables en el temps actual (cell/mL)
$X_{V,i-1}$	Concentració de cèl·lules viables en el temps anterior (cell/mL)
$X_{V,màx}$	Concentració de cèl·lules viables màxima (cell/mL)
$\bar{X}_{V,i}$	Concentració mitjana de cèl·lules viables en un interval de temps (cell/mL)
$Y_{Lac/Gluc}$	Rendiment lactat/glucosa (mmol/mmol)
$Y_{O_2/Gluc}$	Rendiment oxigen/glucosa (mmol/mmol)
ΔP	Variació de la concentració de producte (mM)
ΔP_{i+1}	Variació de la concentració de producte en el temps següent (mM)
ΔS	Variació de la concentració de substrat (mM)
ΔS_{i+1}	Variació de la concentració de substrat en el temps següent (mM)
Δt	Interval de temps (h)
Δt_i	Interval de temps entre el temps el actual i l'anterior (h)
Δt_{i+1}	Interval de temps entre el temps següent i l'actual (h)
γ	Velocitat de cisallament (<i>shear rate</i>) per al mòdul de microfiltració (s^{-1})
Ψ	Senyal d'empaquetament del genoma adenoviral
μ	Velocitat específica de creixement (h^{-1})
μ_d	Velocitat específica de mort (h^{-1})
$\mu_{màx}$	Velocitat específica de creixement màxima (h^{-1})
$\mu_{OUR,i}$	Velocitat específica de creixement estimada a partir del consum d'oxigen en el temps actual (h^{-1})
η	Rendiment de llit cromatogràfic utilitzat (%)

Abreviatura	Descripció
σ	Coeficient de rebuig de diafiltració
τ_{HF}	Temps de residència al filtre de fibres buides (min)
%GFP(+)	Percentatge de cèl·lules GFP positives detectades per citometria
%GFP(-)	Percentatge de cèl·lules GFP negatives detectades per citometria

1. RESUM

1. RESUM

En les últimes dues dècades, la teràpia gènica ha permès plantejar noves aproximacions en l'àmbit de la medicina personalitzada. Es troba orientada a guarir malalties actualment incurables i/o a millorar ostensiblement la qualitat de vida dels pacients, gràcies a la introducció de material genètic al nucli de la cèl·lula diana per permetre, augmentar o suprimir l'expressió d'un gen específic amb finalitat terapèutica. El vector és l'agent que juga el paper cabdal en aquest mecanisme. D'entre els possibles tipus (virals i no virals), destaca el vector adenoviral per la seva preeminència en els actuals assajos preclínics amb humans i per la necessitat de proveir demandes de mercat importants.

El present treball aborda el desenvolupament complet d'un bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals per a teràpia gènica: estudia els diferents aspectes que conformen el bioprocés, i analitza la implementació a escala industrial de la millor alternativa possible.

Com a punt de partida, es realitzen estudis previs per conèixer la interacció dels vectors adenovirals amb les línies cel·lulars productores existents. S'aprofundeix en les tècniques de cultiu de dos candidats cel·lulars concrets: HEK293 (adherent) i HEK293S (no adherent). A partir de la infecció d'ambdós amb el vector adenoviral, es caracteritzen els principals paràmetres del cicle infectiu, els quals permeten concloure que la línia cel·lular HEK293S resulta més apropiada en base a una major productivitat.

Aquestes dades proporcionen la base per desenvolupar l'etapa de producció del bioprocés. Aquesta s'estructura entorn als tres factors fonamentals que descriuen la bioreacció (el monitoratge, l'estratègia i el sistema de producció), els quals s'analitzen en profunditat. Es demostra la validesa del mètode de la velocitat de consum d'oxigen (OUR) per realitzar el monitoratge en línia de l'activitat cel·lular durant les fases de creixement i d'infecció. Posteriorment, es decideix avaluar dues estratègies de producció: l'estratègia en discontinu (estratègia de referència) i l'estratègia en continu amb perfusió (estratègia que proporciona les condicions el més semblants possibles a les que tindria la cèl·lula *in vivo*). Finalment, s'apliquen els anteriors factors en l'anàlisi del sistema de producció, en concret, amb la utilització de dues alternatives: l'anomenat sistema convencional (bioreactor de tanc agitat Biostat Bplus) i el sistema no convencional (bioreactor basat en tecnologia d'un sol ús *Wave Bioreactor*). A partir dels resultats obtinguts, es pot constatar que l'estratègia de producció en continu amb perfusió proporciona elevades concentracions cel·lulars, incrementant-se també tant la productivitat com la concentració vírica final. D'altra banda, també es posen de manifest els avantatges operacionals del sistema de cultiu no convencional, encara que sacrificant la possibilitat d'utilitzar la mesura de la velocitat de consum d'oxigen (OUR).

Per tal de completar el treball, es desenvolupa l'etapa de purificació del bioprocés. En aquesta s'analitzen les propietats del producte i del brou de cultiu, i s'avaluen dues estratègies de purificació. Aquestes es diferencien fonamentalment per la seva possibilitat de facilitar el canvi d'escala, de manera que es dissenyen com a estratègia de purificació no escalable (basada en la ultracentrifugació) i escalable (basada en la cromatografia). La primera és comunament emprada a escala de laboratori; donat que es recull específicament la banda de densitat que conté el vector adenoviral, s'implementa per obtenir material amb una elevada puresa que serveixi com a referència a l'hora de comparar els resultats obtinguts amb l'estratègia escalable. Per portar a terme aquesta última, es dissenyen les operacions que la integren, i es determinen els paràmetres de purificació, entre ells el rendiment global de recuperació del producte final. Posteriorment, es realitza la caracterització del producte per determinar el seu grau de puresa. Els resultats obtinguts deixen palès que l'estratègia escalable presenta un rendiment global superior al de la no escalable, tot i que el grau de puresa aconseguit és inferior.

Les dades experimentals, tant de la producció com de la purificació, permeten disposar de quatre alternatives amb l'objectiu d'analitzar la potencial implantació del bioprocés a escala industrial. El disseny i la comparació de les mateixes es realitza d'acord amb el seu dimensionament seguint unes bases de disseny comunes, i la seva valoració final es projecta en termes econòmics. A partir dels resultats obtinguts, l'alternativa més aconsellable d'ésser portada a la pràctica és la basada en el bioprocés integrat pel sistema de producció no convencional operant en continu amb perfusió.

Aquesta memòria s'estructura, doncs, de manera que inicialment es fa una introducció (capítol 2), on es revisen les característiques de la teràpia gènica, dels vectors adenovirals i de les línies cel·lulars productores, així com del bioprocés i de l'estricta normativa de producció GMP que el regeix. Seguidament (capítol 3), es plantegen els principals objectius del treball. A continuació (capítol 4), es concentren els estudis previs que caracteritzen tant la línia cel·lular productora com la infecció amb el vector adenoviral. Al capítol 5, es presenta el desenvolupament de l'etapa de producció del bioprocés. Anàlogament, en el capítol 6, es desenvolupa l'etapa de purificació del mateix. En el capítol 7, es realitza l'anàlisi de procés de les alternatives sorgides. En el capítol 8, s'exposen les principals conclusions extretes del treball. Finalment, es presenten els materials i mètodes emprats (capítol 9), i s'afegeix l'apèndix (capítol 10), on es complementen alguns aspectes concrets d'aquest treball.

2. INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ

L'obtenció de nous productes destinats al camp de la salut humana ha estat històricament dominada per la indústria farmacèutica, mitjançant la fabricació d'infinat de principis actius per síntesi química a partir de reactius i catalitzadors inerts. Tot i els èxits assolits, bona part d'aquests productes encara no ha pogut aportar cura eficaç a malalties que afecten sectors cada vegada més amplis de la societat, com per exemple el càncer o les afeccions de tipus neurodegeneratiu.

La medicina requeria, doncs, d'un nou impuls basat en l'estudi de les malalties des d'una vessant més molecular i en l'aplicació de solucions més eficaces i específiques. No va ser fins a la segona meitat del segle XX, quan descobriments com el de l'estructura del DNA per part de Watson i Crick van donar peu a tot un seguit de nou coneixement, el qual va acabar plasmant-se en una sèrie de tècniques moleculars que van permetre el sorgiment progressiu de noves ciències com la genòmica, la proteòmica o la biotecnologia, entre d'altres. Precisament, la introducció d'aquestes disciplines auxiliars al camp de les ciències de la vida ha suposat tota una revolució, la qual ha permès el desenvolupament d'una nova indústria de caire biotecnològic i l'obtenció de nous tractaments terapèutics en forma de medicaments impensables uns anys enrere, els anomenats biofàrmacs.

En contraposició als fàrmacs tradicionals, els quals solen ser petites molècules orgàniques amb una sèrie de grups funcionals, altament estables i fàcils d'administrar en diferents formats, com per exemple l'Aspirina composta per àcid acetilsalicílic; els biofàrmacs es poden definir com a productes terapèutics o de diagnosi igualment destinats a la cura de malalties, els quals consisteixen en unitats d'estructura biològica complexa, com poden ser majoritàriament proteïnes (anticossos monoclonals), vacunes o cèl·lules [1].

A la Figura 2.1, es compara el grau de complexitat estructural dels dos tipus de medicaments.

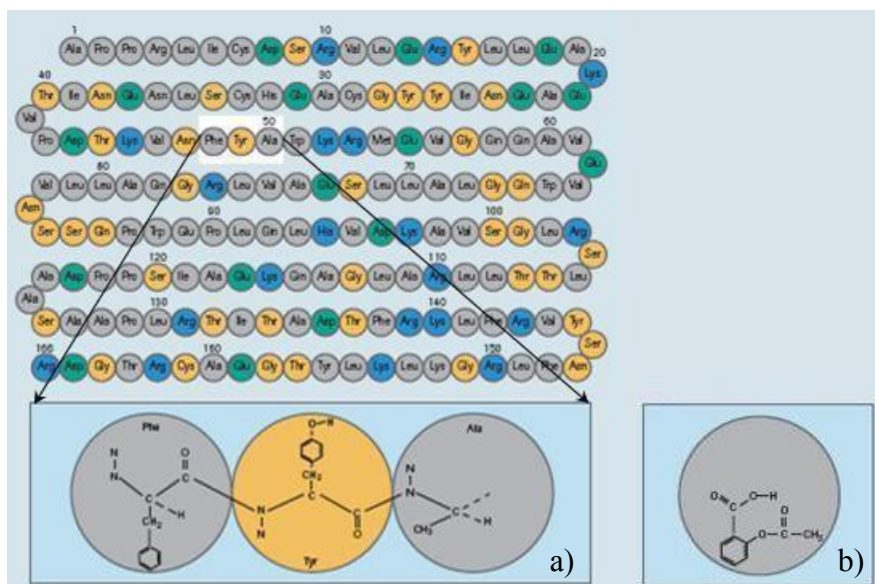


Figura 2.1. Estructura d'un biofàrmac i un fàrmac: a) Eritropoetina, seqüència d'aminoàcids; b) Àcid acetilsalicílic [1].

L'obtenció dels biofàrmacs es caracteritza per la utilització de processos biotecnològics basats en el cultiu d'un biocatalitzador: una cèl·lula eucariota o procariota que esdevé el producte en sí mateix, el produeix de forma natural o mitjançant alguna modificació genètica.

Inicialment, la tendència a utilitzar cèl·lules procarotes per obtenir biofàrmacs va ser la primera opció considerada degut als seus nombrosos avantatges (control de contaminacions més fàcil, majors productivitats, medis de cultiu amb menys requeriments i, en conseqüència, més econòmics, etc...), i es van dissenyar processos tan importants com el d'obtenció d'insulina en bacteris o llevats per part de companyies tan importants com Novo Nordisk o Genentech. No obstant, hi ha certs desavantatges que limiten la producció de determinats agents terapèutics o de diagnòstic amb aquests microorganismes, especialment quan es tracta de produir biomolècules complexes com algunes proteïnes. Sense anar més lluny, la baixa capacitat que presenten per realitzar un correcte tractament posttraduccional de les mateixes (glicosilació, plegament tridimensional, etc...) pot fer que la biomolècula esdevingui fisiològicament inactiva [2]. És en aquest context, quan es va començar a considerar el cultiu de cèl·lules animals.

Les tècniques de cultiu *in vitro* d'aquestes cèl·lules es van establir a mitjans del segle XX, com a suport d'estudis toxicològics, i no va ser fins més tard que es van iniciar les seves aplicacions industrials. En concret, aquestes tècniques es van desenvolupar gràcies a la utilització de cèl·lules per a la producció de vacunes: les cèl·lules eren cultivades per a la seva subsegüent infecció amb el virus. Posteriorment, es va aprovar l'ús de línies cel·lulars per part de les agències reguladores i els avenços de l'enginyeria genètica van aconseguir modificar el genoma per produir un augment substancial en el nombre de nous productes. Paral·lelament, degut a les incessants necessitats del mercat, la interacció d'aquests aspectes a nivell

molecular amb altres disciplines, com l'enginyeria, va donar lloc a processos optimitzats de producció i purificació a gran escala [3].

L'evolució de la producció de biofàrmacs en els darrers anys ha estat molt positiva, i s'espera que aquesta tendència es mantingui en el futur. L'associació de fabricants farmacèutics d'Estats Units (PhRMA) realitza anualment un estudi sobre el nombre de biofàrmacs que s'estan desenvolupant en el mercat nord-americà. La tendència de l'any 2000 fins al 2008 es pot observar a la Figura 2.2, on es destaca el seu creixement a l'alça entre 2006 i 2008.

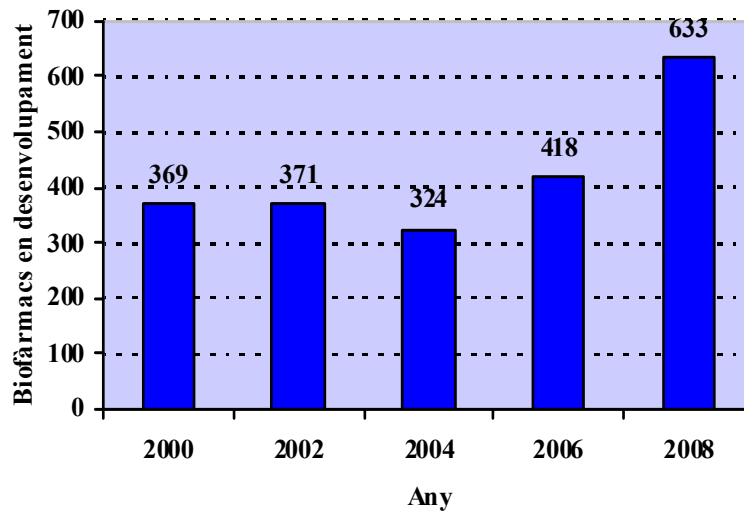


Figura 2.2. Evolució del nombre de biofàrmacs en desenvolupament als Estats Units [4].

Les dades de l'informe de l'any 2008, representades segons les categories a les quals pertanyen aquests productes, es mostren a la Figura 2.3. Aquests inclouen, entre d'altres, vacunes dissenyades per activar el sistema immunològic en front de malalties com la SIDA o diversos tipus de càncer, i anticossos monoclonals dirigits al tractament de malalties sense cura com la malaltia de Crohn o bé que afecten tants sectors de la població com l'asma [4].

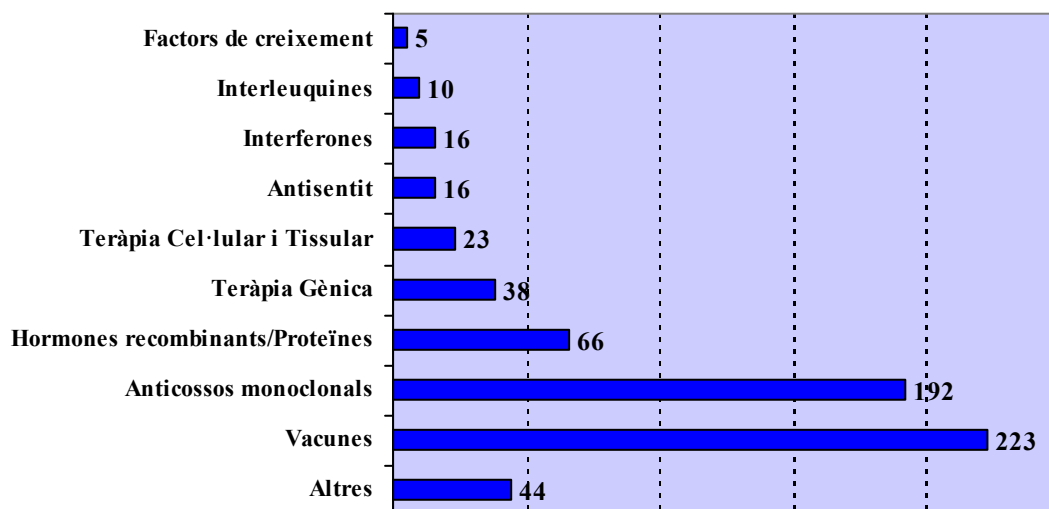


Figura 2.3. Productes terapèutics d'origen biotecnològic en desenvolupament als Estats Units durant l'any 2008 [4].

Els biofàrmacs són productes innovadors, que no substituiran molts dels productes farmacèutics actuals, però sí que aposten decididament per l'evolució cap a una medicina més personalitzada que minimitzi els períodes de tractament i els possibles efectes secundaris. És a dir, una medicina que es trobi més enfocada a les necessitats individuals de cada pacient, fonamentada en la diagnosi molecular i no únicament en la simptomatologia. De ben segur, la seva aplicació farà que malalties actualment incurables deixin de ser-ho a curt o mitjà termini.

És en aquest context, on apareixen les noves teràpies cel·lular, tissular i gènica, les quals estan rebent moltes inversions i s'estan desenvolupant amb bons resultats; bona prova d'això són els 61 biofàrmacs en desenvolupament durant l'any 2008. En el cas de les teràpies cel·lulars i/o tissulars, els incessants avanços experimentats en camps com l'estudi de les cèl·lules mare, la seva expansió i diferenciació cap a diferents tipus cel·lulars ja plantegen la possibilitat a mitjà termini de reemplaçar o reparar òrgans i/o teixits malmesos.

La teràpia gènica comparteix l'entusiasme de les anteriors i és al voltant d'aquesta àrea de coneixement on el present treball centra la seva aplicació.

2.1. Teràpia Gènica

La teràpia gènica proposa una innovadora alternativa en el camp de la medicina, basada en la introducció de material genètic forà (DNA o RNA) a l'interior del nucli d'una cèl·lula diana per permetre, augmentar o suprimir l'expressió d'un gen específic amb finalitat terapèutica. Es tracta d'una disciplina fortament complexa on convergeixen i es coordinen camps del coneixement tan diversos com la biologia molecular, la genòmica, la virologia o la biotecnologia, entre d'altres [5].

Teòricament, la idea que la teràpia gènica proposa en el tractament de certes malalties, planteja una sèrie d'avantatges molt interessants sobre altres opcions terapèutiques aplicades en l'actualitat, com per exemple el tractament amb anticossos monoclonals: la possibilitat de reemplaçar de per vida freqüents i incòmodes injeccions per al pacient d'un principi actiu, moltes vegades car, per una única aplicació que guareixi a nivell genètic específicament certes cèl·lules i/o teixits, fa que aquesta alternativa es presenti com molt atractiva, i ofereixi moltes possibilitats.

Contràriament al que hom pot pensar, la teràpia gènica no només es basa en el fet d'introduir el gen en les cèl·lules del pacient. Aquest només és un dels múltiples processos de caire molt complex que es donen al cos humà, molts dels quals encara romanen desconeguts per als investigadors. Prèviament, un cop el vector és administrat de forma local o sistèmica en el pacient, ha de trobar i actuar sobre la cèl·lula diana, la qual pot o no formar part d'un teixit, i superar les barreres de les membranes citoplasmàtica i nuclear. Una vegada al nucli, el gen terapèutic ha d'ésser transcrit i modificar el genoma cel·lular per corregir la disfunció, o bé, donar lloc a una proteïna terapèutica que interactui amb la mateixa cèl·lula o d'altres.

Existeixen dos tipus d'estratègies terapèutiques o protocols d'aplicació fonamentals (veure Figura 2.4):

- Teràpia *ex vivo*: consisteix en l'extracció de l'organisme de cèl·lules diana, la seva expansió *in vitro* i posterior reintroducció, de manera autòloga o heteròloga, després d'èsser transfectades amb el gen terapèutic i seleccionades.
- Teràpia *in vivo*: es basa en l'administració directa del material gènic directament a l'organisme. Respecte l'estratègia anterior, no es tracta d'una estratègia personalitzada per a cada pacient, però implica una major comoditat per a aquest i un menor cost econòmic.

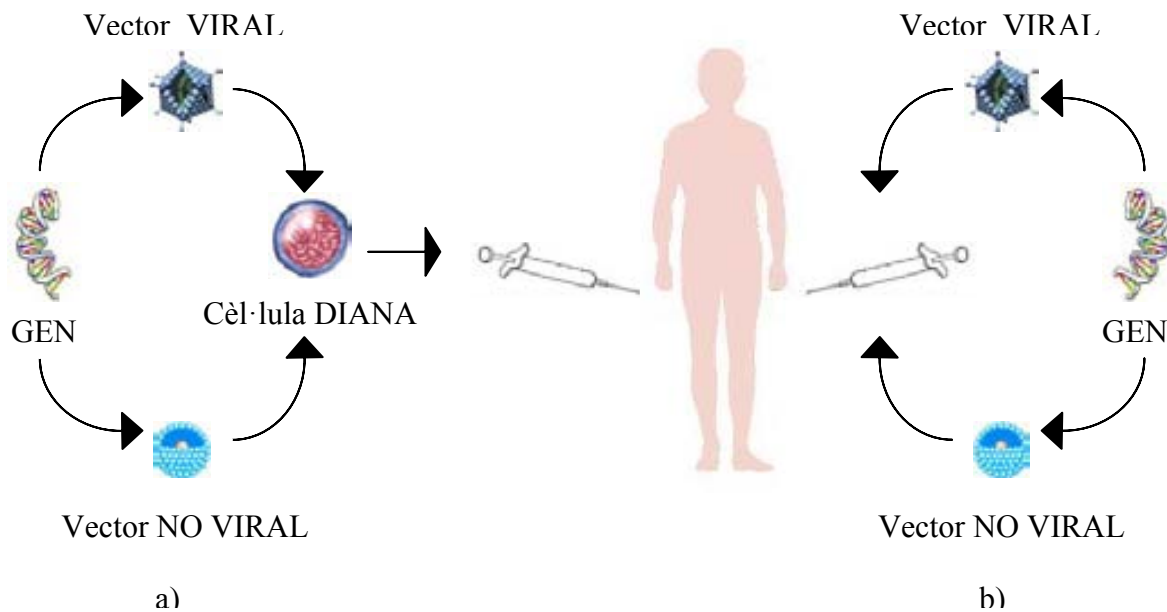


Figura 2.4. Tipus d'estratègies terapèutiques utilitzades en teràpia gènica: a) *ex vivo*; b) *in vivo*.

L'elecció del tipus d'estratègia que s'aplicarà en cada cas, és el resultat d'extensos estudis per a cada tipus de malaltia estudiada, que adrecen aspectes com ara la facilitat de transfecció de les cèl·lules a guarir, l'habilitat per accedir fins a aquestes i aïllar-les, etc...

Els elements clau per a l'èxit de la teràpia gènica són la selecció del gen terapèutic adequat, és a dir, aquell que degut a la seva sobreexpressió o mancança jugui un paper cabdal en la patologia a tractar, i de l'element portador del gen, comunament conegut com a vector. Aquest últim, descrit en profunditat als apartats posteriors, es pot classificar en dos tipus segons el seu origen: viral i no viral. És indispensable que hagi provat la seva eficàcia i seguretat en models animals preclínic abans d'èsser utilitzat en humans.

Cal afegir finalment, que el desenvolupament de la teràpia gènica es troba sotmès a un estricte control per part d'agències reguladores estatals (FDA, EMEA, etc...), mitjançant el qual es tracta de garantir la seguretat i eficiència dels tractaments que rebin aprovació.

2.1.1. Antecedents històrics.

Des dels seus inicis, el camp de la teràpia gènica ha estat objecte d'una intensa crítica i escepticisme per part d'alguns sectors de la comunitat científica, però sobretot per part de l'opinió pública. Caldria però recordar que els pacients que han format, formen i formaran part dels assajos, es troben severament afectats per malalties incurables fins al moment i, probablement, ja han provat altres tractaments que han resultat inefectius. En aquest sentit, resulta molt interessant destacar que bona part dels esforços per impulsar el desenvolupament i aplicació de la teràpia gènica es realitzen a través d'organitzacions sense ànim de lucre creades per associacions d'afectats i són finançades, en part, a través de col·lectes totalment voluntàries. Un exemple molt clar és l'organització francesa anomenada Genethon, la qual es va crear l'any 1991 per l'Associació Francesa contra les Miopaties (AFM).

Un bon indicador de l'evolució històrica que ha experimentat l'aplicació de teràpia gènica es pot observar en el nombre de proves clíniques permeses en el món (veure Figura 2.5). Aquestes dades provenen directament de les fetes públiques per les agències reguladores mundials, i es troben actualitzades a data de setembre de l'any 2008 en la direcció d'Internet propietat de la revista *Journal of Gene Medicine*, <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>.

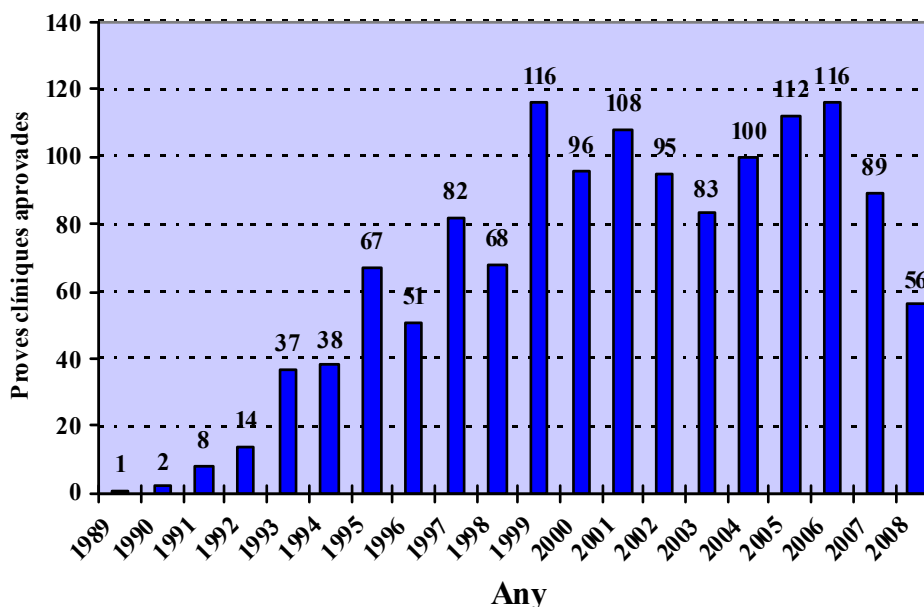


Figura 2.5. Proves clíniques de teràpia gènica aprovades a nivell mundial en el període 1989 – 2008 [6].

Des de l'any 1989 quan es va aprovar la primera prova, la tendència va ser d'increment fins a l'any 1999 on es va obtenir el nombre màxim d'assajos aprovats (116). A partir d'aquest moment i degut als fets adversos ocorreguts l'any 1999, els quals es mencionaran posteriorment, el ritme d'aprovació va caure donat que varies agències reguladores van suspendre temporalment moltes de les proves previstes. Així, l'any 2003, només es van autoritzar 83 noves proves, el nombre més baix des de l'any 1998. No obstant, posteriors bons resultats van tornar a revifar les expectatives i el nombre d'aprovacions es va incrementar

progressivament fins a l'any 2006 amb un nou màxim (116). A partir d'aquest any, el nombre de proves clíniques va tornar a disminuir fins a les 56 finals de l'any 2008. Per entendre les fluctuacions descrites, cal analitzar les fites més significatives de la teràpia gènica que s'han donat al llarg d'aquest període de temps.

No va ser fins l'any 1990 que es va produir el primer assaig clínic autoritzat amb humans a Estats Units, seguint una estratègia *ex vivo*. A un pacient amb un trastorn autosòmic recessiu, consistent en la deficiència del gen que codifica per a l'adenosina desaminasa (ADA), se li varen reintroduir cèl·lules T, les quals havien estat modificades genèticament amb l'ajuda d'un vector retroviral per expressar el gen correcte [7]. El resultat positiu d'aquest experiment va disparar les expectatives, afavorí la inversió i augmentà els esforços en recerca; es van portar a terme nombrosos estudis preclínics amb animals que aportaven més proves de concepte per a múltiples aplicacions possibles. L'any 1993 es va emprar per primera vegada l'adenovirus com a portador d'informació genètica en el tractament de la fibrosi quística [8].

Tot i aquests progressos, un contratemps molt greu es va produir el setembre de l'any 1999. Durant unes proves clíniques a la universitat de Pensilvània, un malalt de 18 anys deficient en el gen que codifica per a l'ornitina transcarbamilasa (OTC), un enzim hepàtic, va morir després de l'administració d'un vector adenoviral, degut a una resposta immunològica massiva del seu organisme. Aquest fet va obligar la cancel·lació de totes les proves amb vectors adenovirals i l'obertura d'una profunda investigació per part de l'agència reguladora dels Estats Units (FDA) durant 5 anys; la qual va concloure que s'havien contravingut les normes imposades en aquest cas concret, i que, per tant, calia fer un seguiment més exhaustiu i estricte de la resta de proves clíniques que s'estaven realitzant en paral·lel [9].

Afortunadament, en un període de temps inferior a un any, es va publicar el major èxit fins al moment aconseguit per la teràpia gènica. L'any 2000 a França, Cavazzana-Calvo i el seu equip van publicar els resultats d'un estudi, on dos "infants-bombolla" amb un desordre d'immunodeficiència severa combinada (SCID-X1) foren curats, després de reinfondre'ls cèl·lules autòlogues CD34 de moll d'os transfectades *ex vivo* amb un vector retroviral que codificava pel gen curatiu [10]. Dissortadament, altres pacients tractats també amb el mateix protocol van desenvolupar leucèmia, degut a la integració incorrecta del retrovirus en el seu genoma.

Un cas molt similar va succeir a Alemanya l'abril de 2006 durant les proves clíniques de les fases I i II destinades al tractament de la malaltia granulomatosa crònica, una malaltia genètica que afecta els macròfags de la sang. Cèl·lules CD34+ de sang perifèrica van ser modificades amb un retrovirus i reintroduïdes en tres pacients [11]. Un dels tres va morir d'una infecció bacteriana, degut a la pèrdua d'expressió del gen terapèutic. L'octubre del mateix any, es van publicar els resultats d'una altra prova de fase I amb 12 pacients que tractava la malaltia de Parkinson. CERE-120, un producte basat en un virus adeno-associat, va aconseguir la reducció de fins a un 40% del símptomes d'aquesta malaltia [6].

L'evolució dels resultats de les proves clíniques, arrel sobretot dels fets de setembre de 1999, pot explicar que el nombre de proves no continués incrementant-se com ho havia fet, i la tendència d'aquestes fos a fluctuar d'ençà fins a l'actualitat.

Més enllà de tots aquests assajos, el primer producte de teràpia gènica va ser aprovat l'any 2003 per l'agència reguladora xinesa (SFDA), i es comercialitza en aquest país des de l'abril de 2004 sota el nom de Gendicina. Es tracta d'un vector adenoviral que expressa el gen oncosupressor p53 per al tractament de càncers de cap i coll, i va ser desenvolupat per la companyia biotecnològica, Sibiono GeneTech.

No obstant, a la vista dels resultats publicats de les proves clíniques realitzades amb la Gendicina, la comunitat científica internacional manté certes reticències sobre l'eficàcia terapèutica d'aquest biofàrmac. Fins al moment, els resultats de les fases I i II en pacients amb càncer han estat només publicats en revistes mèdiques xineses. L'únic article internacional sobre les proves és una revisió que resumeix les dades [12], el valor de les quals ha quedat qüestionat per diversos grups de recerca, ja que sembla que omet informació significativa quan es compara amb l'article en xinès [6]. Malgrat aquesta informació, hi ha hagut pacients d'arreu del món que han volat fins a Xina per provar el tractament, i la companyia va declarar que a desembre de 2006 havia tractat més de 4.000 pacients amb la Gendicina. De manera que a occident, es continuen realitzant proves clíniques amb nous productes sense que, de moment, cap d'ells hagi superat la fase clínica III abans d'irrompre al mercat.

Tant l'experiència acumulada amb les proves clíniques, com la poca presència de biofàrmacs basats en teràpia gènica permet concloure que la teràpia gènica no ha tingut una aplicació tan ràpida i generalitzada, com s'havia previst en els seus inicis. Aquest fet no vol dir que no assoleixi l'èxit definitiu en alguna malaltia, degut al potencial terapèutic que continua tenint, però sota assajos molt més supervisats i, potser també, en combinació amb altres teràpies de tipus cel·lular.

2.1.2. Aplicacions

Durant molt de temps, les malalties d'origen hereditari monogènic van ser el principal objectiu de les aplicacions de teràpia gènica. Així, afeccions com la deficiència d'adenosina desamina (ADA) i d'ornitina transcarbamilasa (OTC), la immunodeficiència severa combinada i la malaltia granulomatosa crònica han proporcionat els resultats més satisfactoris per a la teràpia gènica. Des de l'any 2004, però, aquesta perspectiva es va modificar i va ser orientada cap a dues noves aplicacions que tenen més impacte social i, dissortadament, més prevalença, com són el càncer i les malalties cardiovasculars.

A la Figura 2.6, es pot observar la representació d'aquestes dades, juntament amb la resta d'aplicacions més importants durant el període 1989-2008.

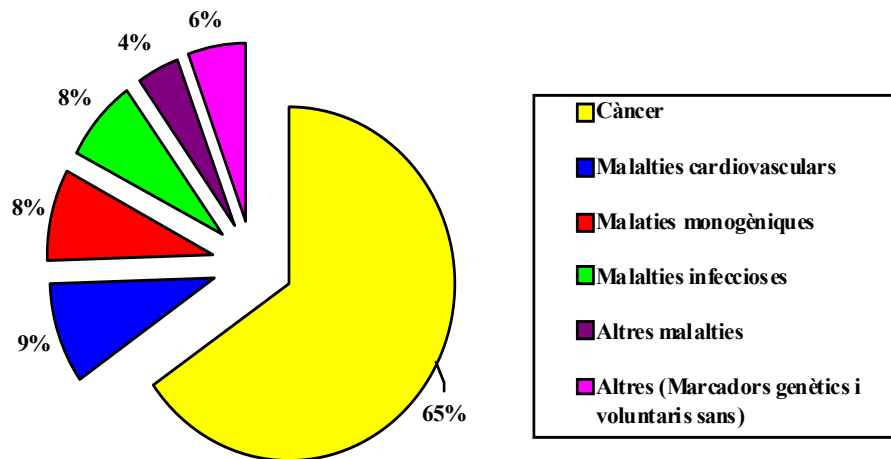


Figura 2.6. Aplicacions terapèutiques tractades per teràpia gènica a nivell mundial en el període 1989 – 2008 [6].

- Càncer: amb una àmplia diferència, la majoria de proves clíniques s'han centrat en el tractament del càncer, pràcticament dos de cada tres assajos. Varis tipus de càncer han estat l'objectiu, incloent els de pulmó, pell, cap, coll, etc... i sobre aquests s'han aplicat tot un seguit d'estratègies, des de l'expressió de gens oncosupressors com el p53 (cas de la Gendicina), fins a la immunoteràpia basada en intensificar la resposta immunològica contra el tumor.
- Malalties cardiovasculars: la major part dels assajos s'han centrat en el tractament d'isquèmies mitjançant l'angiogènesi terapèutica per incrementar el flux sanguini a les regions del cor que ho necessitin.
- Malalties monogèniques hereditàries: tal i com s'ha comentat, originàriament la raó de ser de la teràpia gènica. Actualment bona part dels esforços dirigits a aquest tipus de malalties se centra en el tractament de la fibrosi quística que és la malaltia genètica més comú en els països occidentals. Malgrat tot, no es deixen de banda la resta de malalties històricament tractades, ja que encara no s'han trobat remeis que les guareixin totalment.
- Malalties infeccioses: com és el cas del tractament de la SIDA o d'infeccions amb el virus del tètanus o el citomegalovirus.
- Altres malalties: entre les quals es troben malalties neurològiques (malaltia de Parkinson i Alzheimer, esclerosi múltiple, etc...) i oculars (glaucoma i degeneració macular).

Finalment, cal comentar l'estat en el qual es troben actualment les proves clíniques. La gran majoria dels assajos es troben en Fase I, i per tant, lluny encara d'esdevenir productes que puguin ser aprovats. Només un 3% del total es troba a fase III i amb expectatives reals de ser alguna vegada comercialitzats [6]. Es calcula que les opcions d'un producte per a profilaxi humana que inicia les fases clíniques són d'un 0,1% d'èxit [13].

2.2. Vectors per a teràpia gènica

Els vectors són l'element vehicular clau per permetre la transferència del material genètic exogen a l'interior de la cèl·lula i aconseguir els nivells d'expressió desitjats del transgen d'interès que ajudi el restabliment de la malaltia [14]. En general, per construir aquests vectors és necessari generar els plasmidis que els incloguin i incorporar-los en plataformes que facilitin i assegurin al màxim la introducció dins de la cèl·lula diana.

Les propietats del vector ideal poden variar, però, en qualsevol cas, condicionaran enormement l'èxit del procés de transferència gènica en qualsevol de les seves etapes [15]. Aquestes propietats es poden resumir en els següents punts:

- Capacitat per transportar material gènic de gran mida i protegir-lo de la seva degradació abans d'assolir el nucli cel·lular.
- Gran eficiència d'internalització del material gènic.
- Expressió adequada, eficaç, estable i regulada del transgen durant el període de temps necessari.
- Alta especificitat per la cèl·lula o teixit diana.
- Baixa o nul·la immunogenicitat.
- Baixa toxicitat intrínseca.
- Facilitat de manipulació i producció.
- Alt grau de seguretat biològica, tant per al pacient com per a l'entorn.
- Baix cost de producció.

En l'actualitat, no es disposa d'un vector ideal, òptim i prou versàtil com per adaptar-se íntegrament a la nombrosa casuística derivada de l'aplicació de la teràpia gènica. De manera que cal considerar l'ampli ventall de vectors que existeix.

2.2.1. Tipus de vectors

Com s'ha dit en apartats anteriors, els vectors utilitzats en teràpia gènica es poden classificar en dos tipus segons la seva procedència: no viral i viral. Tot i això, existeixen autors que identifiquen un tercer tipus, tot anomenant-lo vector físic, però que en realitat només fan referència a les tècniques amb les quals un vector no viral és introduït a l'interior de la cèl·lula diana [14].

A la Figura 2.7 es pot observar la distribució dels principals vectors que conformen aquests dos tipus en totes les proves clíniques de teràpia gènica desenvolupades fins al moment.

Els vectors virals són els més emprats, tot i que paulatinament els no virals, per la seva senzillesa i seguretat, van guanyant terreny i s'usen amb més freqüència en un mínim d'un 26% del total de proves. L'elecció del tipus de vector adequat davant de cada afecció dependrà de les característiques d'aquesta, així com dels avantatges i inconvenients de cadascun d'ells [16].

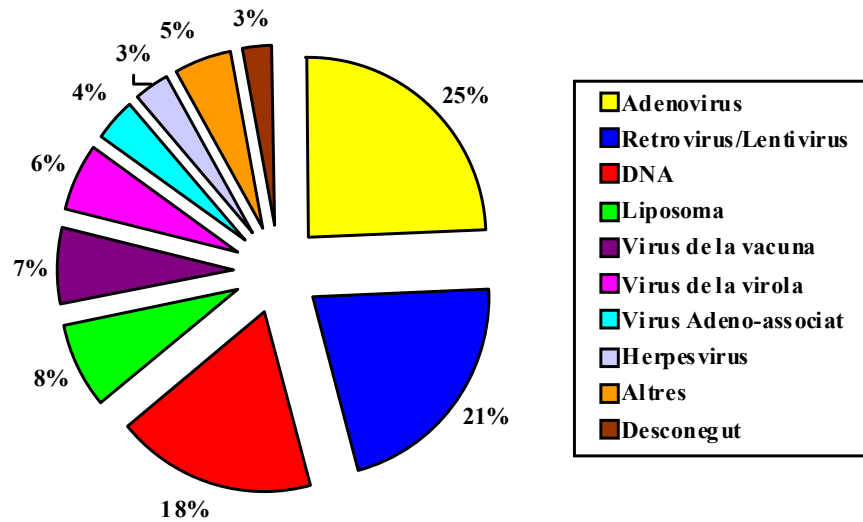


Figura 2.7. Tipus de vectors virals i no virals en proves clíniques per a teràpia gènica [6].

2.2.1.1. Vectors no virals

Els vectors no virals disposen d'una estructura bàsica molt senzilla, formada exclusivament pel plasmidi de DNA que conté el transgen d'interès. També poden incorporar una altra subunitat que consisteix en un agent complexant sintètic que serveix per donar més estabilitat a l'estructura resultant [17].

Els vectors no virals es divideixen principalment en tres categories: DNA nu, liposomes i polímers. Tots ells comparteixen una sèrie de característiques, les quals es detallen tot seguit:

- Presenten una alta facilitat d'obtenció que prové de la seva senzillesa estructural.
- Permeten la incorporació de fragments de DNA de mida superior a la que poden incloure els vectors virals.
- Provoquen una resposta immunològica nul·la o molt baixa, en part, degut a la seva baixa toxicitat. Per tant, poden ser administrats de forma reiterada.
- No obstant, els seus principals inconvenients radiquen en la baixa eficiència de transfecció, menor que la dels vectors virals, especialment *in vivo*, i en què són vectors poc específics.

A la Taula 2.1, es disposa d'un resum dels principals avantatges i desavantatges de cada categoria, derivats del seu ús.

2.2.1.1.1. DNA nu

Aquest és el vector no viral més important i emprat degut a la seva senzillesa. S'injecta de forma directa en el teixit desitjat en la seva forma circular i tancada covalentment. Mentre que la seva acció és pràcticament nul·la en cèl·lules tractades *ex vivo*, s'han reportat estudis on es demostra la seva eficiència de transfecció en teixit muscular i epitelial, després d'un protocol d'aplicació *in vivo* [18, 19].

Vector no viral	Avantatges	Desavantatges
DNA nu	<ul style="list-style-type: none"> • Eficàcia clínica provada en algunes malalties • Baixa immunogenicitat • Producció simple i econòmica • Alta estabilitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Expressió del transgen molt reduïda en el temps • Ineficiència de transfecció en cèl·lules <i>ex vivo</i>
Liposomes (Lípids catiónics)	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció alta en cèl·lules <i>ex vivo</i> • Baixa immunogenicitat • Producció simple i econòmica • Alta estabilitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Ineficiència de transfecció en cèl·lules <i>in vivo</i> • Expressió del transgen molt reduïda en el temps • Experiència clínica reduïda
Polímers catiónics	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció alta en cèl·lules <i>ex vivo</i> • Baixa immunogenicitat • Producció simple i econòmica • Alta estabilitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Ineficiència de transfecció en cèl·lules <i>in vivo</i> • Expressió del transgen molt reduïda en el temps • En fase de desenvolupament, sense experiència en proves clíniques amb humans

Taula 2.1. Resum dels principals avantatges i desavantatges dels vectors no virals.

El DNA no pot ser obtingut de forma econòmica i simple en bacteris, i no provoca cap resposta immunològica. Tot i això, té una sèrie d'inconvenients que encara no s'han solucionat, com poden ser la seva baixa eficiència de transfecció (inferior a la dels vectors virals), període d'expressió molt breu en la majoria de teixits, alta degradabilitat per part de les nucleases presents a la sang i, finalment, inespecificitat total per les cèl·lules o teixits diana [14].

2.2.1.1.2. Liposomes o lípids catiónics

Els lípids catiónics s'enllacen mitjançant una interacció electrostàtica amb el DNA, carregat negativament degut a la cadena de fosfats de la doble hèlix, i donen lloc a un liposoma on el DNA resta substancialment protegit de la degradació per acció de nucleases. Aquests complexos aprofiten les seves càrregues electrostàtiques netes per interaccionar amb proteïnes de membrana que permeten la seva fixació a la cèl·lula i la posterior penetració.

S'ha observat un nivell raonable de transfecció en les cèl·lules endotelials del teixit pulmonar, per això aquests vectors s'han provat en el tractament de la fibrosi quística, tot i que la duració de l'expressió no va ser suficient com per poder observar algun efecte terapèutic [20, 21]. A banda de la curta durada de l'expressió, altres desavantatges dels lípids catiónics són l'heterogeneïtat de la seva estructura, la baixa especificitat i eficiència de transfecció, probablement deguda a l'ineficient procés d'introducció a la cèl·lula.

2.2.1.1.3. Polímers

En aquest cas, els lípids són substituïts per altres polímers catiónics que serveixen per condensar el DNA via interaccions electrostàtiques. A diferència dels lípids, aquests polímers permeten l'addició de lligands que intenten millorar l'eficiència de transfecció. Els polímers més emprats són la polilisina i la polietilenamina (PEI) [22]. En ocasions, s'ha observat que els polímers poden agregar en condicions fisiològiques formant entitats massa grans per penetrar de forma efectiva els teixits diana i les cèl·lules que els componen, fet que afecta negativament l'eficiència de transfecció.

De moment, aquests vectors requereixen més desenvolupament i la seva potencialitat s'està avaluant a nivell d'estudis preclínic en animals, sense existir cap prova clínica aprovada.

2.2.1.2. Vectors virals

Els virus, mitjançant el seu procés infecciós natural, són l'organisme natural més evolucionat i eficient per transferir material genètic exogen a l'interior de les cèl·lules. Aquest fet els situa en una posició immillorable per esdevenir vectors.

El desenvolupament òptim del vector viral, i la principal raó que els diferencia del virus nadiu, es basa en la introducció dels gens terapèutics en el seu genoma i l'eliminació de tots aquells que codifiquen per a proteïnes virals nocives. Per tant, del virus nadiu només s'aprofiten les seves excel·lents propietats com a missatger i alliberador de material genètic al nucli de la cèl·lula [17].

Els vectors virals més emprats en teràpia genètica es basen principalment en les següents

classes de virus: retrovirus, lentivirus, adeno-associats, herpesvirus i adenovirus. No obstant, actualment s'estan desenvolupant altres vectors virals basats en el citomegalovirus humà [23], en el virus Epstein-Barr [24, 25], en el poxvirus [26] i en alfavirus [27]. També es treballa en l'aplicació virus híbrids adenovirus-retrovirus que estan aportant resultats prometedors [28].

L'elecció del tipus de vector viral adequat per tal d'obtenir una teràpia amb èxit requereix l'estudi dels inconvenients i avantatges de cadascun d'ells, així com de la malaltia i el tipus cel·lular que cal tractar.

A la Taula 2.2, es recull un resum dels principals avantatges i desavantatges que ofereix el seu ús. A continuació, es proporciona una descripció molt més detallada de les característiques de cadascun d'ells, i de forma resumida es recull a la Taula 2.3.

2.2.1.2.1. Retrovirus

Els retrovirus van ser els primers vectors emprats en teràpia gènica. Són virus d'estructura esfèrica amb un diàmetre de 120 nm aproximadament, els quals contenen RNA de cadena senzilla amb 7-11 kb com a genoma. Durant el cicle d'infecció natural, el RNA víric es transcriu a DNA de cadena doble, gràcies a l'acció de l'enzim transcriptasa inversa, un cop el virus es troba a l'interior del citoplasma. El DNA és transportat a l'interior del nucli on s'integra de forma aleatòria al genoma cel·lular. Com a conseqüència, les cèl·lules infectades fabriquen virus de forma constant sense afectar el seu funcionament habitual durant períodes de temps perllongats. Aquest fet fa del vector retroviral un candidat molt interessant per a teràpies gèniques *ex vivo*.

Tot i això, tenen una sèrie de inconvenients que han de ser prèviament solucionats. El més important radica en la seva pobra expressió *in vivo*, la qual s'ha de solucionar amb l'ús de promotors específics del teixit. D'altra banda, la seva baixa capacitat d'infectar cèl·lules quiescents restringeix encara més l'ús d'aquest vector. No obstant i per superar aquesta limitació, s'estan generant nous pseudotipus que integren proteïnes a la càpside d'altres virus i aquestes els fan ser menys làbils i més efectius [29]. Un altre important impediment que frena la seva utilització és la pobra producció i forta fragilitat durant el procés de purificació, la qual cosa fa difícil assolir dosis terapèutiques [30]. Finalment, i encara que els nivells d'immunogenicitat són baixos, la mida límit del transgen no pot superar les 8 kb.

Com s'ha comentat anteriorment, els vectors retrovirals van ser els primers vectors virals emprats en teràpia humana, per corregir la deficiència d'adenosina desaminasa (ADA). El tractament va millorar les condicions físiques dels pacients i l'expressió del gen va ser estable durant anys [7].

2.2.1.2.2. Lentivirus

Encara que els lentivirus pertanyen a la classe del virus retroviral, les seves especials característiques aconsellen descriure'ls de forma independent.

La major part del lentivirus emprats en teràpia gènica procedeixen del virus d'immunodeficiència humana (VIH) [31]. En contrast amb els retrovirals, els vectors

Vector viral	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció alta en cèl·lules <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> • Transfecta cèl·lules en divisió i quiescents • Experiència clínica substancial • Títols de producció elevats 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta immunogenicitat • Mida límit del transgen aproximadament de 8 kb • Expressió del transgen reduïda en el temps
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció alta en cèl·lules <i>ex vivo</i> • Expressió del transgen perllongada en el temps • Experiència clínica substancial • Baixa immunogenicitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció baixa en cèl·lules <i>in vivo</i> • Mida límit del transgen aproximadament de 8 kb • Transfecta només cèl·lules en divisió • Perill de mutagènesi insercional • Títols de producció baixos
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecta cèl·lules en divisió i quiescents • Transfecta cèl·lules mare hematopoètiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Experiència clínica reduïda • Títols de producció baixos • Procedent del virus d'immunodeficiència VIH-1
Adeno-associats	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiència de transfecció alta en cèl·lules <i>in vivo</i> • Expressió del transgen perllongada en el temps • Baixa immunogenicitat 	<ul style="list-style-type: none"> • Mida límit del transgen aproximadament de 4,5 kb • Perill de mutagènesi insercional • Títols de producció moderats
Herpesvirus	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecta cèl·lules en divisió i quiescents • Mida límit del transgen de 30 kb 	<ul style="list-style-type: none"> • Experiència clínica reduïda

Taula 2.2. Resum dels principals avantatges i desavantatges dels vectors virals.

Vector viral	Adenovirus	Retrovirus	Lentivirus	Adeno-associats	Herpesvirus
Estratègia terapèutica	<i>In vivo</i> i <i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i> i <i>Ex vivo</i>
Tropisme	Tumors, cèl·lules hematopoètiques	Cèl·lules mare i hematopoètiques	Sistema nerviós central, fetge, múscul	Fetge, múscul, Retina	Sistema nerviós central i perifèric, múscul, cèl·lules mare i hematopoètiques
Dificultat en el disseny i/o producció	Moderada	Moderada	Alta	Alta	Alta
Eficiència de la transfecció	Molt alta	Baixa	Baixa - Moderada	Moderada - Alta	Alta
Mida del transgen (kb)	5 - 8	< 4 - 5	8 - 9	< 4 - 5	< 30
Títol de producció (UI/mL)	Alts (10^{11} - 10^{14})	Baixos (10^5 - 10^7)	Baixos (10^2 - 10^{10})	Mitjans (10^9 - 10^{13})	-
Duració de l'expressió	7-14 dies	Molt llarga (Integració)	Molt llarga (Integració)	Molt llarga (Integració)	Molt llarga (Integració)
Immunogenicitat	Molt alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Seguretat	Alta	Baixa (mutagènesi insercional)	Baixa (mutagènesi insercional)	Mitjana (mutagènesi insercional)	Mitjana (mutagènesi insercional)

Taula 2.3. Resum de les característiques dels principals vectors virals [15].

lentivirals poden infectar eficientment cèl·lules en divisió i quiescents, així com un ampli espectre de teixits i cèl·lules *in vivo*. Aquests vectors s'han utilitzat per introduir gens directament en teixit muscular o hepàtic mitjançant la injecció directa d'entre $1 \cdot 10^7$ i $3 \cdot 10^7$ unitats infectives, sense símptomes d'inflamació i amb una baixa resposta immunològica per part de l'organisme [32]. Per altra part, també s'han realitzat proves clíniques utilitzant vectors retrovirals i cèl·lules mare hematopoètiques que expressen els gens *ex vivo* [33].

Els desavantatges en l'ús de vectors lentivirals en proves clíniques actualment radica en la preocupació i desconfiança que genera el virus VIH del qual provenen. A més, cal perfeccionar els mètodes de producció perquè minimitzin la presència de virus autoreplicatius, tot optimitzant la deleció dels gens virals perillosos i obtenint línies cel·lulars productores el més segures possibles.

2.2.1.2.3. Adeno-associats

El virus adeno-associat (AAV) és un virus d'estructura icosaèdrica molt simple amb un diàmetre de 18-26 nm, el qual conté un genoma format per DNA de cadena senzilla amb 5 kb. Aquest s'ha establert com un dels sistemes més emprats per a la transferència de material genètic, donat que permet una expressió del transgen molt eficient i perllongada en el temps en diversos tipus cel·lulars i teixits, tals com hepàtic, muscular, retinal o en el sistema nerviós central [34].

La possibilitat d'eliminar la major part del genoma viral, i la seva posterior substitució pel DNA que codifica el gen terapèutic, permet que provoqui una baixa resposta immunològica. D'altra banda, el principal inconvenient de l'ús de vectors adeno-associats per a teràpia es basa en la dificultat per produir-los a gran escala, ja que es requereix a part de la línia cel·lular, la coinfecció amb un altre virus. Aquest fet provoca problemes de baixa concentració final, contaminació amb el virus auxiliar i d'encariment del posterior procés de purificació. D'altra banda, la seva capacitat d'empaquetament és relativament reduïda, de fins a 4,5 kb [14].

2.2.1.2.4. Herpesvirus

Aquesta família de virus és enormement heterogènia. El seu material genètic es troba compost per DNA lineal de doble cadena de mida variable. Així, mentre la mida del genoma del virus de l'herpes símplex arriba a les 152 kb, el citomegalovirus pot tenir fins a 220 kb. El potencial d'aquests virus com a vectors genètics recau en l'habilitat de transportar grans seqüències de DNA exogen (fins a 30 kb) i en la seva habilitat per establir infeccions latents de llarga durada en la cèl·lula diana, ja sigui aquesta quiescent o es trobi en divisió. El genoma viral resideix com un episoma sense efectes negatius per a la cèl·lula. Si aquesta és proliferativa, el virus es replicarà coordinadament amb la divisió cel·lular i serà heretat per la progènie.

Aquesta latència fa molt interessant la utilització del vector en línies cel·lulars on es desitja l'expressió del transgen de per vida, com per exemple en el teixit neuronal per combatre malalties neurodegeneratives, caracteritzades per ser cròniques [35]. D'altra banda, una nova

aplicació dels vectors herpesvirals és la lluita contra el càncer, mitjançant l'expressió de gens que portin a la destrucció del mateix tumor en vectors no replicatius; o bé, mitjançant la injecció de vectors replicatius citotòxics que acabin amb les cèl·lules del tumor [17].

2.2.1.2.5. Adenovirus

Es tracta del vector viral més emprat actualment en les proves clíniques de teràpia gènica, tal i com ha quedat palès a la Figura 2.7. Les seves característiques principals són les següents:

- Tropisme molt ampli, tot infectant nombrosos tipus cel·lulars.
- Infecció de cèl·lules quiescents, així com de cèl·lules en divisió.
- Alta eficiència de transfecció: alta expressió del transgen.
- No requereixen de la integració en el seu cicle infectiu. El material gènic s'expressa de forma episomal.
- Alta immunogenicitat.
- Els processos de construcció, manipulació i producció són relativament senzills en comparació amb altres vectors. Són virus estables i s'obtenen títols elevats (de l'ordre de 10^3 - 10^4 virus per cèl·lula).
- No s'han descrit patologies greus associades a l'adenovirus nadiu.
- Toxicitat reduïda com a vector i nivell de bioseguretat elevat.

Donada la seva rellevància en la teràpia gènica actual, i a que són l'objecte d'estudi del present treball, els vectors derivats de l'adenovirus es tracten amb molt més detall en el següent apartat.

2.3. Vectors adenovirals

El significat etimològic de la paraula “adenovirus” prové de la forma prefixada grega *adeno*, que vol dir “glàndula”, i del mot llatí *virus* que significa “pus, supuració”. Els adenovirus (Ad) foren descrits per primera vegada com a agents virals únics al 1953 per Rowe i col., mentre es tractava d'establir cultius cel·lulars d'amígdals i teixit glandular (adenoide). Rowe va reconèixer que un agent transmissible atacava les cèl·lules epitelials i les destruïa [36]. Pertanyen a la família *Adenoviridae* i es coneixen aproximadament 50 serotipus humans diferents, dividits en 6 subgrups (de l'A fins al F) en funció de les seves característiques immunològiques, biològiques i de les seqüències genòmiques. Els Ad més caracteritzats i emprats per generar vectors per a teràpia gènica són els serotipus 2 i 5, ambdós pertanyents al subgrup C [15]. De forma natural, els virus que conformen aquest subgrup provoquen en els humans afeccions respiratòries poc greus, mai mortals, com per exemple el refredat comú.

2.3.1. Estructura del virió

L'adenovirus és un virus lític de DNA amb 70-100 nm de diàmetre i un pes molecular de $167 \cdot 10^6$ Da, el qual es caracteritza per l'absència de membrana externa [37]. L'estructura del virió es mostra a la Figura 2.8, i es compon de dues parts fonamentals: la càpside i el genoma [38].

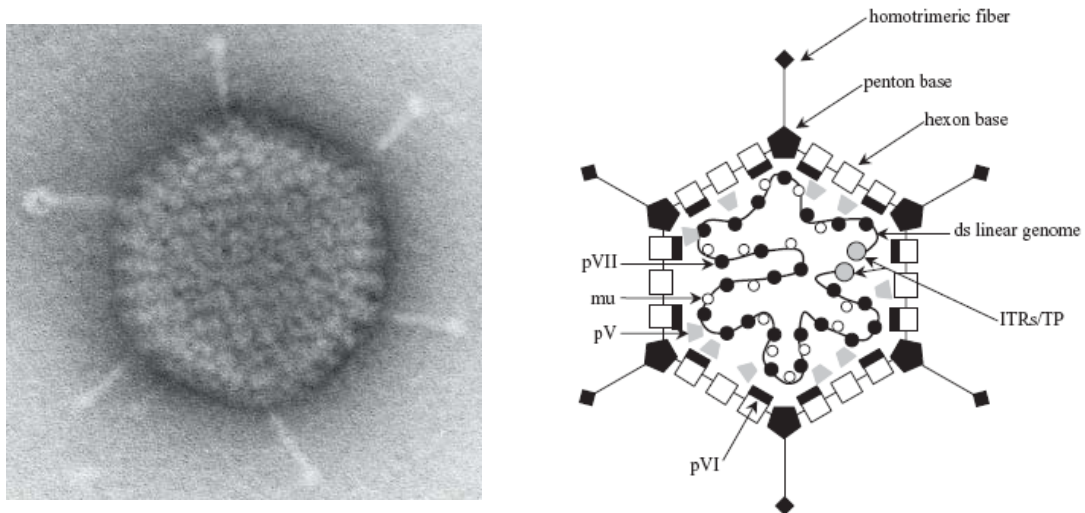


Figura 2.8. Virió: estructura i secció de l'adenovirus serotipus 5 [5].

2.3.1.1. Càpside

Es tracta de l'embolcall extern de geometria icosaèdrica que delimita la partícula. La càpside està constituïda per 252 subunitats anomenades capsòmers que representen el 87% de la massa de la partícula. Aquests es classifiquen en capsòmers-hexon o capsòmers-penton, en funció de si es troben envoltats per sis o cinc capsòmers respectivament. Els capsòmers-hexon formen cadascun dels 20 plànols triangulars que integren l'icosaedre, fins a un total de 240 unitats. Els capsòmers-penton, en canvi, només se situen en els vèrtexs, essent 12 unitats en total. Un altre element fonamental de la càpside són les protuberàncies existents en cadascun dels vèrtexs anomenades fibres, de llargada variable segons el subgrup. Aquestes juguen un paper fonamental en el cicle replicatiu del virió, ja que el seu extrem interacciona amb els receptors de la membrana cel·lular per iniciar la infecció.

Tant els capsòmers com les fibres es troben composts per una sèrie de proteïnes específiques, a banda d'una sèrie de proteïnes que només tenen funcions d'estabilitzar l'estructura. També existeixen unes altres, com les proteïnes V i VII, relacionades amb la compactació del genoma, de forma similar a com ho fan les histones (veure Taula 2.4).

Nom	Localització	Funció
II (Proteïna hexon)	Capsòmer-hexon	Estructural
III (Proteïna penton)	Capsòmer-penton	Estructural
IIIa	Capsòmer-penton	Penetració
IV	Fibra	Unió a receptor de membrana
V	Genoma	Empaquetament del DNA
VI	Capsòmer-hexon	Estabilitzar l'estructura de la càpside
VII	Genoma	Empaquetament del DNA
VIII	Capsòmer-hexon	Estabilitzar l'estructura de la càpside
IX	Capsòmer-hexon	Estabilitzar l'estructura de la càpside

Taula 2.4. Proteïnes estructurals de l'adenovirus serotipus 5 [39].

2.3.1.2. Genoma

El genoma adenoviral es troba constituït per una molècula de DNA lineal de doble cadena aproximadament de 36 kb amb una proteïna terminal unida covalentment a cadascun dels seus extrems 5' (veure Figura 2.9). En ambdós extrems del genoma, es defineixen unes seqüències curtes anomenades repeticions terminals invertides (ITR) d'entre 100 i 140 parells de bases, cadascuna de les quals té com a funció principal l'inici de la replicació.

Per convenció, el mapa del genoma es dibuixa d'esquerra a dreta, i situa a continuació de l'ITR esquerre el senyal d'empaquetament (Ψ). Aquest últim dirigeix l'encapsidació del genoma gràcies a la interacció de diferents proteïnes. La resta del genoma s'organitza entorn de dues regions principals, depenent de que la transcripció del conjunt de gens que les integren sigui anterior o posterior a la replicació del mateix:

- Els gens *early* (E1-E4) són transcrits en les primeres fases de la infecció, abans de la replicació del DNA. En general, aquests alteren el funcionament de la cèl·lula diana i la preparen per suportar la producció de virus.
- Els gens *late* (L1-L5) són transcrits en fases més tardanes, i codifiquen per a la majoria de proteïnes estructurals que conformen el virió i ajuden en el seu encaix.

L'adenovirus serotipus 5 (Ad5), el més emprat en assajos de teràpia gènica, té la seva seqüència genòmica disponible en la base de dades del GenBank amb el codi AC_000008 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC_000008).

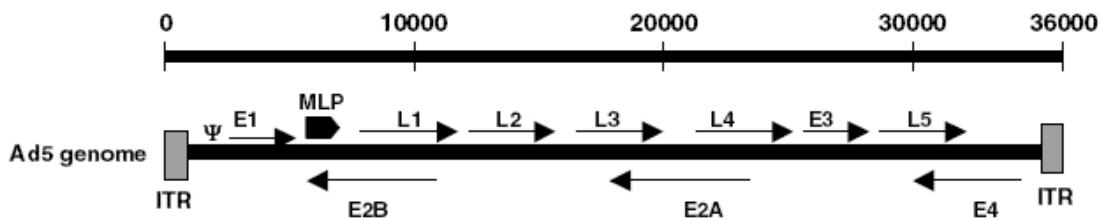


Figura 2.9. Mapa del genoma de l'adenovirus serotipus 5 (Ad5) [40].

2.3.2. Cicle infectiu

Quan els adenovirus infecten una cèl·lula, particularment en el cas dels serotipus 2 i 5, donen lloc a infeccions productives, que són aquelles on el DNA viral es transcriu al nucli, el mRNA es tradueix en el citoplasma i els virions són constituïts novament al nucli, tal i com es pot observar a la Figura 2.10.

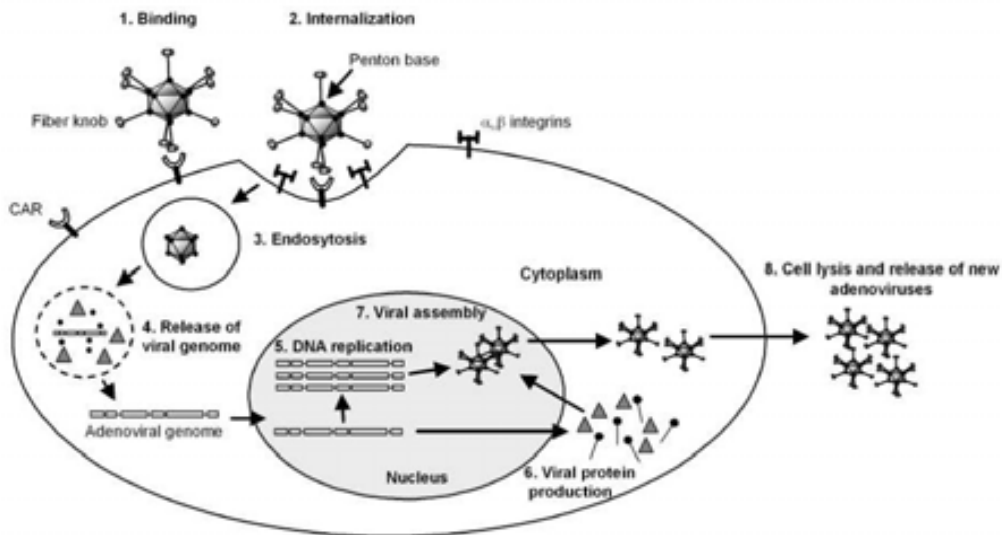


Figura 2.10. Cicle infecciós de l'adenovirus serotipus 5 (Ad5) [41].

Aquestes infeccions requereixen un període d'entre 28 i 48 hores des de l'inici fins al final de cicle, el qual es desenvolupa en les següents etapes:

- **Adsorció:** la unió del virus amb la cèl·lula diana es basa en el contacte entre l'extrem de la fibra adenoviral i els receptors situats a la superfície de la membrana cel·lular. Aquests receptors són específics per a cada subgrup d'adenovirus. En concret per al subgrup C, el principal receptor és l'anomenat de Coxsackie (CAR). El CAR és una proteïna de membrana que pertany a la família de les immunoglobulines i consta de tres dominis: extracel·lular, transmembrana i citoplasmàtic [42]. La presència del CAR condiciona la infectivitat del Ad i la seva absència explica la resistència d'alguns tipus cel·lulars a les infeccions adenovirals [43].
- **Internalització:** té lloc mitjançant un procés d'endocitosi. El procés és promogut per la interacció directa entre els capsòmers-penton de l'adenovirus i les integrines de la membrana cel·lular α_V que actuen com a receptors d'internalització. S'indueixen nombroses vies de senyalització que activen la polimerització i reorganització de l'actina de la membrana per facilitar la formació final d'endosomes recoberts de clatrina.
- **Penetració:** un cop a l'interior del citosol, l'endosoma és degradat per l'acció tòxica del capsòmer-penton i el baix pH que es genera al seu interior. La càpsida es desestructura al llarg del procés d'alliberament per la proteòlisi de la proteïna estructural vírica VI.
- **Migració:** el virió, un cop perduda la integritat de la càpsida, és transportat fins a la membrana nuclear i el genoma víric travessa la membrana nuclear a través dels seus porus. Aquest procés es creu que té lloc gràcies a l'associació del genoma víric, les seves proteïnes estructurals i la proteïna cel·lular p32, i que requereix la participació de deneïna i microtúbuls.
- **Replicació:** la transcripció i replicació del genoma de l'adenovirus té lloc al nucli de la cèl·lula infectada i comença amb la transcripció dels gens *early* (E1-E4). El gen E1 és el primer en ésser transcrit. S'estructura en dues subregions, E1A i E1B, imprescindibles per

a la replicació viral, ja que tenen com a funció, d'una banda, modular el metabolisme cel·lular perquè la cèl·lula sigui susceptible a la replicació del virus i, d'altra, bloquejar la inducció de l'apoptosi [44]. El gen E2, també dividit en dues subregions, E2A i E2B, codifica per a proteïnes indispensables en el procés replicatiu, com per exemple la DNA polimerasa adenoviral (POL) i el precursor de la proteïna terminal (TP) [45]. El gen E3 dóna lloc a nombroses proteïnes involucrades, principalment, en l'evasió de la resposta immunològica. Codifica per a una proteïna anomenada *Adenovirus Death Protein* (ADP) necessària per a l'alliberament eficient de virions del nucli i per a la lisi de la cèl·lula [46]. La regió E4 codifica almenys 6 proteïnes (ORF 1-6/7) que faciliten el metabolisme del mRNA viral, promouen la replicació del DNA viral, l'expressió dels gens *late* i l'aturada de la síntesi de proteïnes cel·lulars [47].

La replicació del DNA viral comença 8 hores després de la infecció. S'inicia en ambdós extrems del genoma viral mitjançant els ITRs i la TP com a motlle per a la síntesi de DNA catalitzada per la POL.

Finalment, comença la fase de transcripció tardana. En aquest moment, pràcticament totes les proteïnes expressades a la cèl·lula infectada són d'origen viral. La transcripció tardana és controlada pel promotor principal tardà (MLP) i comprèn 5 gens (L1-L5), els quals codifiquen les proteïnes estructurals i necessàries per a l'encapsidació del genoma i la posterior maduració dels virions.

- **Construcció:** la síntesi dels virions comença al citoplasma cel·lular amb la formació dels capsòmers i continua al nucli amb la constitució de la càpside i la posterior encapsidació del DNA. El procés d'encapsidació està dirigit per la presència al genoma adenoviral del senyal d'empaquetament (Ψ) situat en l'extrem esquerre.
- **Alliberament:** finalment, la cèl·lula infectada lisa i allibera els virions madurs, mitjançant un procés encara desconegut.

2.3.3. Disseny dels vectors adenovirals

La creació dels vectors adenovirals partint de la modificació genètica dels adenovirus nadius té com a principals objectius crear l'espai necessari al seu material genètic per inserir el fragment de DNA exogen que conté el transgen d'interès i evitar, a la vegada, que el virió pugui autoreplicar-se i donar lloc a alguna patologia, com ho faria de forma natural un cop a l'organisme. Per tant, el seu disseny es basarà en substituir aquelles regions del DNA víric fonamentals per a la replicació i substituir-les per constructes amb el transgen terapèutic. S'han descrit desenes de mètodes per construir adenovirus recombinants defectius i millorar les seves propietats com a transmissors de DNA forà [48].

Bàsicament els adenovirus recombinants replicació-defectius utilitzats com a vectors han donat lloc a tres tipus o generacions, en funció de les regions del genoma que es modifiquen, tal i com es pot observar a la Figura 2.11.

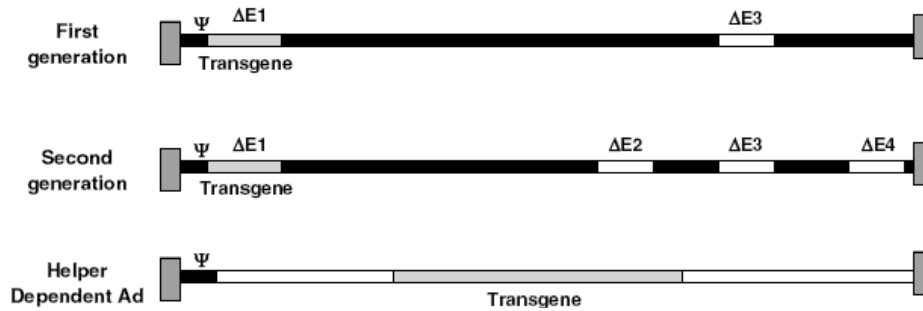


Figura 2.11. Generacions de vectors adenovirals [40].

2.3.3.1. Vectors adenovirals de primera generació

Es generen per la substitució total o parcial de les regions E1 i E3 del seu genoma pel material genètic que es vol transferir. L'eliminació de la regió E1 implica que el Ad recombinant sigui defectiu per a la seva replicació i no pugui autoreplicar-se un cop administrat. Els vectors sense la regió E1 admeten transgens de fins a 5,1 kb. Per augmentar aquesta capacitat, també es tendeix a suprimir la regió E3 que, com s'ha dit, codifica per a proteïnes que ajuden al trencament de la cèl·lula al final de cicle infectiu. Amb aquest afegit, s'augmenta la capacitat d'incloure material genètic fins a 8,2 kb.

2.3.3.2. Vectors adenovirals de segona generació

El principal inconvenient dels vectors de primera generació és la forta resposta immunològica que provoquen en l'organisme, tant contra la càpside viral com front a les proteïnes virals expressades durant la infecció. Aquest fet redueix l'expressió del transgen a l'organisme, donat que els limfòcits T eliminen tant els vectors com les cèl·lules transduïdes.

Per solucionar aquest handicap i augmentar, encara més, la capacitat dels Ad de primera generació, es van desenvolupar els vectors adenovirals de segona generació, tot eliminant altres regions del genoma: les E2 i E4 [49]. No obstant, aquests nous vectors no han donat els resultats esperats i la seva aplicació ha estat molt limitada [50].

2.3.3.3. Vectors adenovirals de tercera generació

Els adenovirus de tercera generació denominats *gutless* o *helper-dependant* constitueixen la classe més evolucionada de vectors adenovirals en l'actualitat. La raó per la qual se'ls anomena *gutless* (literalment, sense entranyes) és perquè el seu genoma no disposa dels gens virals en la seva totalitat, únicament es conserven els ITRs i la seqüència d'encapsidació (Ψ). Com a conseqüència la seva capacitat de transport augmenta fins a les 36 kb.

S'ha demostrat que amb aquests vectors es detecta l'expressió del transgen dos anys després de l'administració en animals; no indueixen resposta immunològica significativa i permeten l'administració reiterada [51].

Tot i això, la producció requereix l'ús obligatori d'un virus auxiliar o *helper* que porti la resta d'elements necessaris per a la replicació de l'adenovirus *gutless*, la qual cosa afecta el procés de producció amb títols no gaire elevats, comparats amb els obtinguts amb vectors adenovirals d'anteriors generacions. Finalment, també afecta el procés de purificació, ja que,

fins al moment, no s'ha aconseguit un lot a gran escala lliure de contaminació per partícules *helper* [15].

2.4. Línies cel·lulars productores de vectors adenovirals

El vector adenoviral és, per definició, un element deficient en quant a la seva capacitat de replicació, donat que, com s'ha dit, li manquen regions genòmiques imprescindibles a tal efecte. És per això que es desenvolupen tot un seguit de tipus cel·lulars transformats amb gens d'origen víric que supleixen la incapacitat del vector per autoreplicar-se, tot aportant les seqüències complementàries que s'han extret del DNA víric. Per aquesta raó, les línies cel·lulars productores de vectors també es denominen complementàries, permissives o empaquetadores.

En funció de les seves característiques de proliferació, les línies cel·lulars productores es poden classificar en dos tipus: línies cel·lulars adherents i no adherents.

2.4.1. Línies cel·lulars adherents

Són línies cel·lulars ancoratge-dependents, és a dir, no inicien la seva proliferació fins que s'han adherit sobre una superfície. L'adhesió cel·lular és un procés que consta de 4 etapes principals (veure Figura 2.12), el coneixement de les quals resulta essencial per cultivar amb èxit les cèl·lules [52, 53]:

- Adsorció: comporta una lleugera unió entre proteïnes de la membrana cel·lular i la superfície del cultiu, normalment d'origen electrostàtic.
- Contacte: la cèl·lula, encara amb morfologia esferoïdal, comença a variar-la per adquirir més àrea de contacte amb la superfície.
- Unió: la cèl·lula encara guanya més àrea i això provoca la ruptura d'algunes unions amb la superfície. La unió es basa en la formació d'enllaços entre receptors transmembrana (per exemple, integrines o cadherines) i punts d'unió situats a la superfície d'adhesió com poden ser algunes proteïnes (per exemple: el col·lagen, la fibronectina i/o la vitronectina).
- Proliferació: la cèl·lula adopta la seva morfologia habitual, normalment fibroblàstica, amb un elevat nombre d'unions a la superfície, i comença el seu cicle de creixement.

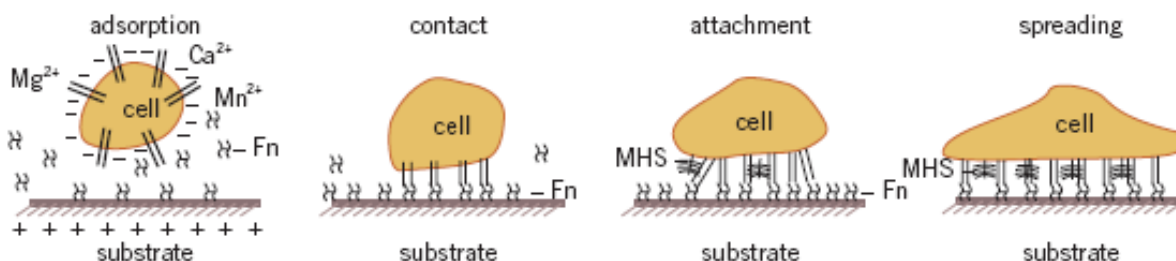


Figura 2.12. Etapes principals del procés d'adhesió cel·lular [52].

Durant totes les etapes, intervenen cations divalents (Ca^{2+} i Mg^{2+}) i proteïnes d'unió que poden ésser aportades via l'addició de sèrums animals als medis de cultiu o bé, recobrint directament les superfícies d'adhesió. A més, per facilitar el procés, la superfície pot ésser hidrofílica i estar carregada electrostàticament, ja que la cèl·lula animal té distribuïdes càrregues negatives a la seva membrana. En general, en el moment que el cultiu ocupa tota la superfície disponible, les cèl·lules detenen la seva duplicació, ja que s'arriba a un estat de confluència on pot existir una inhibició del creixement degut al contacte entre cèl·lules.

La majoria de línies cel·lulars que es cultiven *in vitro*, a excepció de les línies del llinatge hematopoètic, pertanyen a aquest grup.

En concret, la línia cel·lular empaquetadora més estesa per produir vectors adenovirals és de tipus adherent i s'anomena HEK293, la qual prové de ronyó d'embrió humà i es troba modificada genèticament per expressar la regió E1 del genoma del Ad5 humà [54]. Aquest tipus cel·lular es troba molt ben documentat i la productivitat vírica obtinguda és molt elevada; a més és lliure de patents, per la qual cosa s'utilitza a nivell industrial. No obstant, existeix un inconvenient en l'ús de la HEK293, el qual pot provocar riscos de bioseguretat. El disseny genètic de la línia cel·lular no encaixa perfectament amb el genoma del vector (veure Figura 2.13), i pot donar-se un solapament entre les seqüències dels dos genomes, la qual cosa porta a la creació d'adenovirus competents per a la replicació (RCA), gràcies a una recombinació homòloga de les seqüències. Aquest fenomen, pel qual s'obtenen adenovirus capaços de replicar-se de forma natural i sense el transgen terapèutic, succeeix amb una freqüència d'aproximadament d'una vegada cada 10^{-9} replicacions del genoma viral, un valor bastant considerable si el procés es vol portar a escala industrial [55].

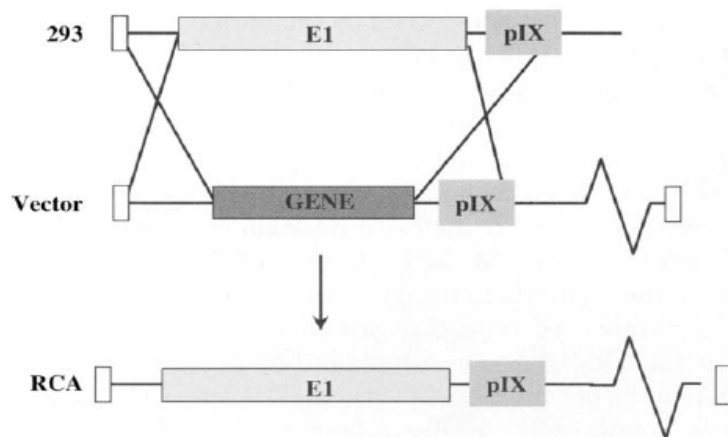


Figura 2.13. Fenomen de recombinació homòloga dels genomes cel·lular i viral per a la formació d'adenovirus competents per a la replicació (RCAs) [39].

Existeixen altres línies cel·lulars adherents on s'ha intentat minimitzar la seqüència de DNA que provoca aquest solapament, com per exemple en les cèl·lules 911, originàries de retinoblast d'embrió humà, les quals també s'han transformat per expressar la regió E1. Aquestes presenten un nivell de recombinació homòloga lleugerament inferior al de les HEK293, però la productivitat vírica és tres vegades més alta [56]. Un altre cas de línia

cel·lular empaquetadora amb baixa freqüència de generació de RCA és la A549, la qual es deriva de teixit de carcinoma alveolar humà.

Finalment, existeixen altres tipus cel·lulars, el disseny genètic dels quals no permet en absolut la producció de RCAs. Aquests és el cas de la línia N52.E6 provinent d'amniòcits humans, de la que s'obtenen productivitats víriques similars a les obtingudes a les HEK293.

2.4.2. Línies cel·lulars no adherents

Són línies cel·lulars que poden créixer en suspensió en el medi de cultiu. No requereixen de cap superfície sobre la qual adherir-se i, per tant, normalment, poden assolir densitats cel·lulars superiors a les línies adherents.

Originàriament, les línies cel·lulars provinents del llinatge hematopoètic i els seus derivats eren les úniques que pertanyien a aquest grup. Tanmateix, els diversos tipus cel·lulars no adherents emprats en la producció de vectors adenovirals s'obtenen majoritàriament després d'un procés d'adaptació a suspensió de línies cel·lulars inicialment adherents. Mitjançant la pressió selectiva que consisteix en el subcultiu de la línia cel·lular adherent en sistemes amb agitació constant i emprant medis lliures de sèrum, s'aconsegueix modificar el fenotip de certes subpoblacions cel·lulars; aquestes canvien el seu comportament habitual per créixer sense la necessitat d'adherir-se a cap superfície. Al llarg del procés d'adaptació, es poden observar variacions en els paràmetres cinètics originals, com per exemple en la viabilitat cel·lular o en la velocitat específica de creixement i, fins i tot, es poden donar activacions de les vies apoptòtiques. Aquesta resposta al canvis en les condicions de cultiu, es creu que és deguda a perturbacions associades a l'inici de la fase S del cicle cel·lular [57].

Aquest és el procés pel qual s'obté la línia cel·lular designada com a HEK293S, a partir de la línia adherent HEK293. Cal esmentar que, com a conseqüència d'això, la HEK293S hereta els desavantatges de la generació de partícules RCA [58].

L'estratègia per prevenir la creació de RCAs consisteix a eliminar qualsevol seqüència homòloga del genoma cel·lular que inclou les regions virals, i que pugui solapar amb el genoma del vector. La seva aplicació en la creació de la línia cel·lular PER.C6 soluciona definitivament aquest problema.

Aquesta última procedeix de cèl·lules retinals d'embrió humà, les quals van ésser transfectades amb el plasmidi pIG.E1A.E1B sota el control del promotor de la fosfoglicerat quinasa (PGK). Es troba fortament documentada i és actualment la cèl·lula que creix en suspensió més establerta per a aplicacions industrials. Dissortadament, aquesta línia cel·lular només està disponible a través del pagament dels seus drets d'ús a l'empresa propietària (Crucell), degut a la patent sota la qual es troba sotmesa. Les productivitats víriques són molt similars a les obtingudes amb la HEK293 en adherència [59].

2.5. Bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals

Les necessitats de vectors adenovirals per satisfer l'important nombre de proves clíniques que s'estan portant a terme, juntament amb la possibilitat real que s'aprovi un nou biofàrmac basat en els mateixos en Estats Units o Europa, tal i com ha succeït amb el cas de la Gendicina a la Xina, obliguen a que l'obtenció d'aquests vectors canviï d'escala i es dissenyin nous bioprocessos amb volums de cultiu superiors als que, fins al moment, es disposava a escala de laboratori. El volum de la nova escala industrial restarà fixat pel nombre de dosis de producte requerides i per la productivitat que del vector se n'obtingui.

Aquesta productivitat és funció dels resultats obtinguts en les múltiples fases que integren el bioprocés; fins i tot, abans de la definició de les tradicionals etapes productiva i de purificació [60]. D'aquesta manera, els estudis previs centrats en la modificació molecular del vector per incorporar el gen terapèutic i la selecció de la línia cel·lular productora, així com les de parametrització i caracterització dels primers cultius (determinació de condicions de cultiu i elecció del medi de creixement òptim) esdevenen també clau per donar al bioprocés global una major competitivitat i una posició predominant en el mercat.

A continuació, cal fer una descripció en profunditat de les principals característiques i elements que integren les etapes de producció i purificació en el bioprocés d'obtenció de vectors adenovirals. D'altra banda, a la Taula 2.5 es recullen les principals característiques d'una sèrie de bioprocessos industrials d'obtenció de vectors adenovirals que diverses companyies exploten en l'actualitat [61].

2.5.1. Producció

A grans trets, la producció de vectors adenovirals es basa en el creixement de la línia cel·lular empaquetadora en un sistema de cultiu fins a una determinada concentració, en la qual les cèl·lules es trobin en l'adequat estat fisiològic, per iniciar la seva infecció amb el vector adenoviral d'interès i, finalment, aturar el procés quan conclouï el cicle de replicació vírica i l'empaquetament dels virions sigui complet. Resulta, doncs, fonamental optimitzar la producció per assegurar la seva reproductibilitat i minimitzar la quantitat d'etapes d'escalat, d'equips i de manipulacions necessàries per aconseguir la quantitat de producte desitjada. Tot plegat repercutirà decisivament en un menor cost econòmic global i en una major competitivitat.

L'element principal del procés de producció és el sistema de cultiu, on té lloc l'esmentat creixement cel·lular i la posterior infecció. A mesura que es vol operar a una escala superior, tot incrementant el volum total o bé del nombre d'unitats, aquests sistemes van tenint configuracions molt heterogènies i poden anar augmentant la seva complexitat operacional. Típicament per a aplicacions de teràpia gènica i degut a l'encara relativament reduït nombre de pacients que s'està tractant, a excepció de la Gendicina, l'escala de producció es mou al

Companyia		Canji	Schering	Introgen	Merck	Berlex	Sibiono GeneTech
Producció	Ad Serotipus	Ad5	Ad5	No especificat	Ad5	Ad5	Ad5
	Línia cel·lular	HEK293 GT	HEK293	HEK293	PER.C6	PER.C6	SBN-Cel (Subclon HEK293)
	Procés	Adherència	Adherència	Suspensió	Suspensió	Suspensió	Adherència
	Estratègia de producció	Perfusió amb microsuports	Discontinu i perfusió amb microsuports	Discontinu	Discontinu	Discontinu	Perfusió en llit fix
	Volum (L)	5	160	100	240	3-10	14
	Medi	Medi amb sèrum	Medi amb sèrum	Medi sense sèrum	Medi sense sèrum	Medi sense sèrum	Medi amb sèrum
Purificació	Fracció tractada	Cèl·lules	Cèl·lules i sobrenedant	Cèl·lules i sobrenedant	Cèl·lules i sobrenedant	Cèl·lules	No especificada
	Lisi cel·lular	Congelació i descongelació	No especificat	Detergent	Detergent	Disrupció	No especificada
	Clarificació	Centrifugació	Filtració	Filtració	Filtració	Centrifugació	No especificada
	Concentració	Centrifugació	No especificat	Ultrafiltració	Ultrafiltració	Centrifugació	No especificada
	Ús de nucleasa	Sí	No especificat	Sí	Opcional	No especificat	No especificada
	Purificació primària	Intercanvi aniònic	Intercanvi aniònic	Intercanvi aniònic	Intercanvi aniònic	Intercanvi aniònic	No especificada
	Purificació secundària	IMAC	Gel filtració o Hidroxiapatita	-	No especificada	Gel filtració	No especificada
Etapea addicional	-	-	-	Precipitació de DNA	-	No especificada	

Taula 2.5. Processos industrials d'obtenció de vectors adenovirals [61].

voltant dels centenars de litres. Una escala petita comparada, per exemple, amb les produccions d'anticossos monoclonals, les quals poden arribar a disposar d'unitats de fins a 20.000 L de volum total.

D'acord amb el tipus de línia cel·lular seleccionada, existeixen dues alternatives fonamentals de producció: la producció no adherent o en suspensió i la producció adherent. La primera es basa en disposar en el medi de cultiu de la superfície necessària per assolir les necessitats productives; mentre que la segona té com a base només el volum de medi present en el sistema de cultiu.

2.5.1.1. Producció no adherent o en suspensió

Per a processos productius, el fet de prescindir de superfície en el sí del cultiu comporta una major senzillesa en l'operació i en el canvi d'escala. L'homogeneïtat de la fase líquida també fa més efectiva la transferència de matèria i energia. Són aquestes raons per les quals els sistemes de cultiu en suspensió són, a priori, preferits a l'hora de dissenyar qualsevol bioprocés. Aquest fet justifica que durant les etapes de desenvolupament, si el candidat cel·lular creix en adherència, s'intenti adaptar de forma gradual al cultiu en suspensió. D'altra banda, aquests processos en suspensió tendeixen a implementar-se en medis sense sèrum, els quals en trobar-se lliures de components d'origen animal faciliten el procés de purificació i de validació del producte final per ésser emprat en humans.

Inicialment, a una escala de desenvolupament o bé per a petites produccions, els sistemes de cultiu treballen a l'interior d'incubadors, els quals permeten mantenir les condicions d'esterilitat (aire filtrat per filtres HEPA), de pH (atmosfera controlada a un percentatge constant de CO₂) i de temperatura. Aquest és el cas dels flascons agitats (*spinner flasks*) (veure Figura 2.14).



Figura 2.14. Diferents tipus de flascons agitats.

Tots ells disposen d'eixos d'agitació que situats a sobre d'una placa magnètica generen una circulació poc cisallant que no afecta les cèl·lules i facilita l'homogeneïtat del cultiu. El rang de volum operacional oscil·la dels 100 mL fins aproximadament els 3 L; més enllà d'aquest volum, la transferència d'oxigen al sí del cultiu es troba limitada per l'àrea de la interfase gas-líquid disponible a l'interior del flascó, donat que no són sistemes on la transferència d'oxigen sigui forçada.

Per tant, és indispensable disposar de sistemes més intensius i autònoms que no depenguin d'incubadors de CO₂ i, com a conseqüència, disposin dels seus propis sistemes de control d'agitació, temperatura, pH i oxigen dissolt. Aquest són els anomenats bioreactors.

Els bioreactors més habituals per al cultiu de cèl·lules animals en suspensió són els bioreactors de tanc agitat (veure Figura 2.15). Es tracta de bioreactors de tipus convencional, dels quals es té un coneixement molt profund a nivell de disseny per a qualsevol escala d'aplicació: des dels equips de laboratori de pocs litres de volum fins als equips industrials que poden arribar a volums superiors a 20.000 L per a cultius cel·lulars. En tractar-se de sistemes homogenis també es facilita la mesura en línia i el control de les diferents variables del procés.

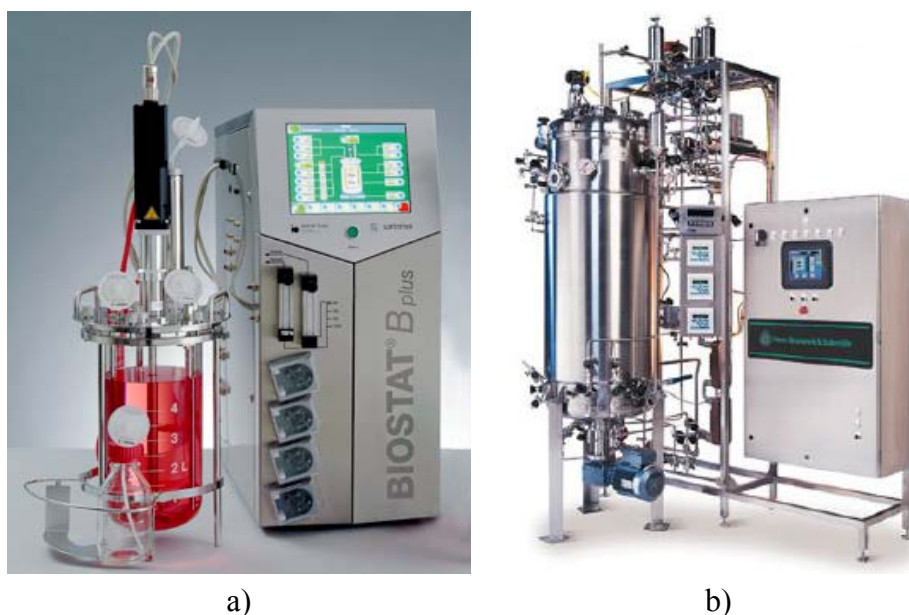


Figura 2.15. Bioreactors de tanc agitat: a) bioreactor escala laboratori; b) bioreactor escala pilot.

Els components principals que els integren es poden resumir en:

- El sistema d'agitació: desenvolupat per reduir l'estrès cel·lular al mínim amb velocitats d'agitació moderades (entre 100 i 200 rpm) i mitjançant eixos amb pales inclinades o hèlices marines, com a alternativa als agitadors de turbina tipus Rushton, més habituals en fermentadors per a cultius microbians.
- El sistema d'aeració o de dispersió de la fase gas: l'aeració del cultiu és de tipus forçada, és a dir, el gas no difon lliurement fins al sí del líquid, com en el cas del flascons agitats, sinó que, normalment, s'introdueix per la part inferior del receptacle, en forma de

(micro)bombolles, dispersant-lo a través de plaques poroses. Per a línies cel·lulars molt sensibles al bombolleig, es poden utilitzar sistemes d'aeració mitjançant la difusió molecular de l'oxigen a través de membranes. La utilització de mòduls de membranes, no obstant, sol restar limitada a bioreactors de laboratori i d'escala pilot, donada la complexitat que presenten en emprar-se a volums més elevats.

- El sistema de control de temperatura: es tracta de bioreactors encamisats o bé disposen de serpentins interns per mantenir la temperatura òptima del cultiu.
- El sistema de control de pH: es porta a terme gràcies a la utilització de tampons com el bicarbonat, i a l'addició de CO₂ a la fase gas o d'àcid/base a la fase líquida.
- El sistema d'esterilització: aquest consisteix directament en un equip auxiliar, com per exemple l'autoclau en el cas d'escala de laboratori, o bé en sistemes acoblats d'esterilització per vapor *in situ*, en el cas que el volum del bioreactor sigui elevat.

A més, les diferents estratègies de producció que es poden portar a terme en el bioreactor de tanc agitat (discontínu, discontínu alimentat, continu o perfusió) li proporcionen més versatilitat, davant les possibles exigències productives que es demani al procés. En el cas concret de la producció de vectors, línies cel·lulars com la HEK293S o bé la PER.C6 que creixen en discontínu poden arribar fàcilment fins a densitats cel·lulars de $3 \cdot 10^6$ cell/mL abans de la infecció i productivitats víriques de l'ordre de 10^3 virus per cèl·lula [62].

Les possibles alternatives al bioreactor de tanc agitat, entre d'altres els anomenats bioreactors agitats per aire (*air-lift*), no tenen cap aplicació en el camp de la producció de vectors adenovirals, degut al fet que són sistemes de cultiu menys coneguts pel que fa al canvi d'escala i complexos operacionalment parlant, donat que l'agitació s'indueix per acció del cabal de gas que a l'hora aporta l'aeració al cultiu.

2.5.1.2. Producció adherent

En aquest cas, el criteri principal per al disseny del sistema de cultiu consisteix en proporcionar suficient àrea com per donar suport a la màxima densitat cel·lular, en comptes d'augmentar el volum total disponible com en el cas dels sistemes de cultiu en suspensió.

Inicialment i per a produccions a petita escala, es fan servir sistemes de cultiu molt senzills, pensats per ésser utilitzats a l'interior d'incubadors de CO₂: sistemes sense agitació i basats en material plàstic d'un sol ús especialment tractat per a l'ancoratge de la cèl·lula productora. Així, trobem els flascons de cultiu (*T-flasks*) (veure Figura 2.16a) on l'àrea disponible per al cultiu oscil·la entre 25 cm²/flascó i 225 cm²/flascó, amb taps que permeten l'intercanvi gasós. Si es vol augmentar l'escala del cultiu, evidentment, es pot augmentar el nombre d'unitats o bé utilitzar sistemes més intensius com els anomenats CellFactory (NalgenNunc), CellSTACK o CellCube (ambdós de Corning); els quals difereixen en les seves característiques operacionals, però, en general, consisteixen en múltiples unitats en forma de prisma rectangular amb molta superfície que se superposen, i de les quals s'obtenen àrees que oscil·len entre 600 cm² i 24.000 cm² (veure Figura 2.16b).

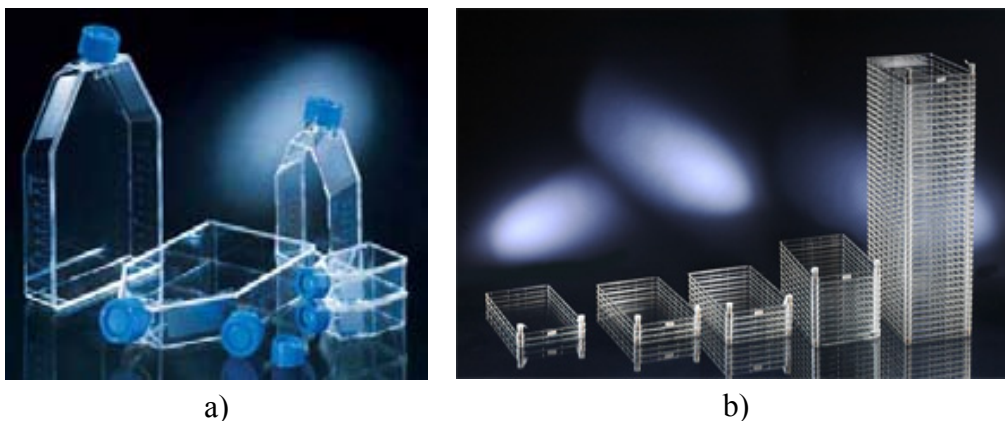


Figura 2.16. Flascons de cultiu: a) *T-flask*; b) *CellFactory*.

Una altra alternativa de cultiu que comparteix trets característics amb les anteriors, i es troba bastant estesa en alguns dels primers processos basats en cèl·lules adherents és la de les ampolles rodants (*roller bottles*) (veure Figura 2.17). Les ampolles cilíndriques de plàstic biocompatible proporcionen una àrea disponible que oscil·la entre 850 cm² i 1.500 cm²; s'inoculen amb una determinada quantitat de medi de cultiu (entre el 10% i el 30% del volum total) i es fan girar lentament sobre el seu eix longitudinal. Les cèl·lules creixen adherides a les parets interiors de l'ampolla i, a mesura que es va produint la rotació, entren en contacte, de forma alternativa, amb els nutrients del medi líquid i l'oxigen de la fase gas.



Figura 2.17. Ampolles rodants (*Roller bottles*).

Tot i l'augment significatiu de l'àrea disponible, els sistemes de cultiu adherent descrits fins al moment, quan es volen implantar a gran escala, generen molts inconvenients com són els costos elevats de material fungible, mà d'obra i, en algunes ocasions, d'equips robòtics o incubadors especialment dissenyats per a la disposició i manipulació automàtica de les unitats. D'altra banda, el risc de contaminació associat a la perllongada manipulació i el poc control de les principals variables de cultiu a mesura que s'augmenta l'escala també són cada vegada més considerables.

De la necessitat de superar aquest problema d'escalabilitat, parteixen alternatives que plantegen aprofitar els trets fonamentals d'altres sistemes de cultiu com els bioreactors de tanc agitat emprats en línies cel·lulars no adherents, degut a la seva major facilitat de canvi d'escala, reproductibilitat operacional, homogeneïtat de cultius i control dels paràmetres. En

aquest context, s'introdueix la producció basada en el cultiu de línies cel·lulars adherents sobre microsuports (*microcarriers*).

Els microsuports són diminutes perles (*beads*) o partícules polimèriques que es poden mantenir en suspensió dins del medi líquid per proporcionar la superfície de colonització necessària en l'adherència de les cèl·lules. El tret fonamental de qualsevol microsuport és l'elevada relació superfície/volum que aporten al bioreactor. A banda d'això, han d'oferir una sèrie de característiques intrínseques com són nul·la toxicitat sobre el creixement cel·lular, gran estabilitat per suportar possibles processos d'esterilització per calor i disposar d'una densitat al voltant de 1,02-1,03 g/mL per facilitar la seva suspensió i sedimentació, si és necessari separar-los del medi de cultiu.

Es comercialitza una àmplia gamma de microsuports (veure exemples a la Figura 2.18), els quals es diferencien no només per la seva geometria (esfèrica, en forma de disc, hexagonal, etc...), sinó també per les seves característiques fisicoquímiques, provinents dels diversos materials de fabricació (vidre, plàstic, cel·lulosa, dextrà, etc...), pel seu diàmetre mitjà (200-250 μm), per la seva densitat, etc... Sovint, la superfície de les partícules es modifica per afavorir l'adherència cel·lular, gràcies a revestiments amb proteïnes que actuen afavorint el procés d'adhesió com poden ser el col·lagen, els proteoglicans, la fibronectina, etc...

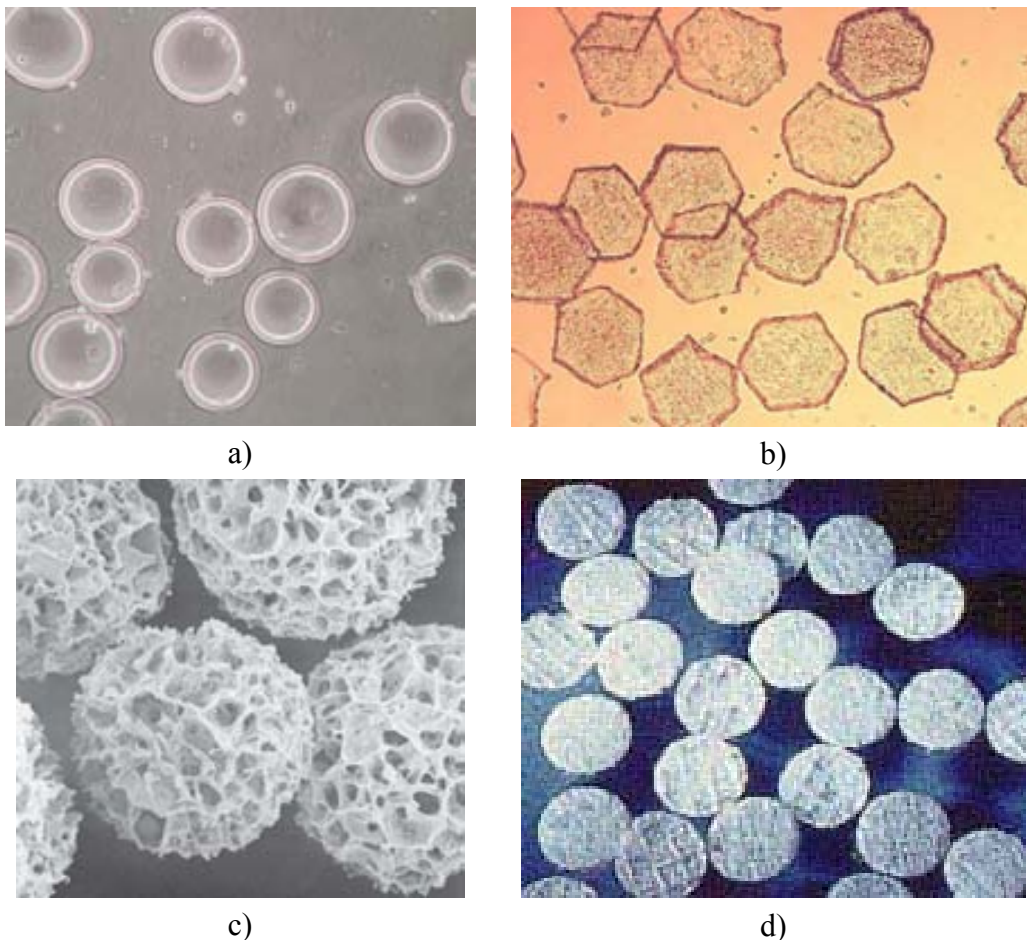


Figura 2.18. Diferents tipus de microsuports: a) Cytodex3; b) MicroHex; c) Cytopore2; d) FibraCel.

Els microsuports poden classificar-se en tres tipus segons la seva estructura:

- Microsuports sòlids: són aquells que ofereixen únicament la seva àrea superficial perquè les cèl·lules quedin adherides. El material de fabricació és normalment vidre o plàstic.
- Microsuports microporosos: són aquells que presenten una estructura en forma de xarxa on només biomolècules amb un pes molecular de fins a 100.000 Da poden penetrar. El material de fabricació són polímers altament reticulats com el dextrà.
- Microsuports macroporosos: són aquells que tenen estructura irregular amb cavitats colonitzables per les cèl·lules i que augmenten, encara més, la relació superfície/volum. Aquest fet pot permetre assolir una major densitat cel·lular i una major productivitat volumètrica del procés. No obstant, es poden donar problemes difusionals de nutrients i oxigen a l'interior dels porus. Tanmateix, el principal inconvenient del seu ús radica en el desancoratge de les cèl·lules, el qual és encara més complicat i fa pràcticament impossible la seva recuperació total.

A la Taula 2.6, s'observa un recull dels principals microsuports emprats en el cas del cultiu cel·lular.

Microsuport	Nom comercial	Material	Proveïdor
SÒLID	Biosilon	Poliestirè	Nunclon
	2D MicroHex	Poliestirè	Nunclon
	Bioplas	Poliestirè	SoloHill Engineering
	Bioglas	Vidre	SoloHill Engineering
MICROPORÓS	Cytodex1	DEAE - dextrà	GE Healthcare
	Cytodex3	Col·lagen - dextrà	GE Healthcare
	FibraCel	Polièster	New Brunswick
MACROPORÓS	Cultisphere	Col·lagen – Gelatina	Hyclone
	Cytopore2	Cel·lulosa	GE Healthcare
	Cytoline	Polietilè	GE Healthcare

Taula 2.6. Principals microsuports comercials.

En el cas concret de la producció de vectors adenovirals, s'ha observat que els microsuports de tipus microporós, com per exemple el Cytodex3, proporcionen majors productivitats víriques que els macroporosos [63]; probablement degut a les limitacions difusionals anteriorment mencionades. Tot i això, el procés d'alliberament de les cèl·lules de la superfície continua sense resoldre's totalment, amb rendiments dispers. Es poden escollir dues maneres d'operar: desancorar les cèl·lules quan encara no han lisat o bé esperar a que ho facin, la qual cosa obliga a tractar un volum molt més important en les posteriors etapes de purificació [64].

Finalment, l'últim sistema de cultiu que es vol mencionar és el Celligen (New Brunswick Scientific) (veure Figura 2.19). Aquest model de bioreactor aprofita la tecnologia anterior per establir un bioreactor de tanc agitat exclusivament dissenyat per al cultiu en adherència, donat que disposa d'una llit fix de microsuports: el medi circula a través d'aquest i proporciona els

nutrients i l'oxigenació adient a les cèl·lules. En concret, aquesta opció és la utilitzada per Sibiono GeneTech en la producció de la Gendicina [61].

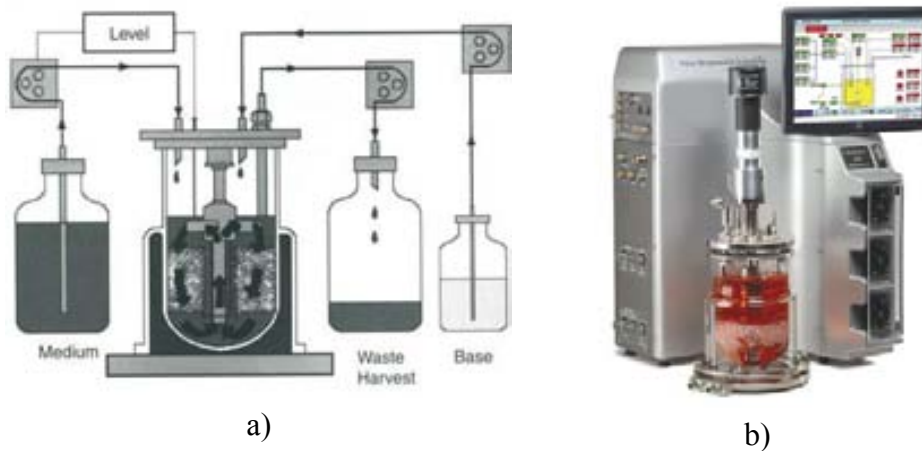


Figura 2.19. Sistema de cultiu Celligen: a) esquema de funcionament; b) bioreactor comercial.

2.5.2. Purificació

Els objectius de la purificació de vectors adenovirals són diversos, però molt similars als de la majoria de biofàrmacs: maximitzar el rendiment global del procés sense perdre la infectivitat del vector, mentre que a la vegada es minimitzen les impureses i els costos econòmics.

En finalitzar la producció, les impureses presents en el medi són molt diverses i amb característiques de diferent naturalesa: restes cel·lulars, DNA, proteïnes en suspensió, etc... D'altra banda, també poden existir virions en diferents estats de maduració, els quals també s'haurien d'eliminar si no són complets, ja que no tenen cap efecte terapèutic i poden provocar resposta immunològica. El procés de purificació ha de contenir, doncs, un seguit d'etapes per captar de la forma més selectiva possible el vector adenoviral final i concentrarlo en el mínim volum possible per ésser dosificat.

Històricament, la purificació de vectors adenovirals data de mitjans segle XX i incloïa una sèrie d'operacions bàsiques entre les quals es trobaven la cromatografia d'intercanvi aniònic i l'extracció bifàsica. No obstant, el baix rendiment del procés va arraconar aquestes tecnologies. En l'actualitat, existeixen dues estratègies de purificació de vectors adenovirals, les quals es diferencien per l'escala a la qual poden ser aplicades: l'estratègia no escalable basada en la ultracentrifugació, i l'estratègia escalable basada en un seguit d'operacions unitàries de filtració i cromatografia.

2.5.2.1. Estratègia no escalable

A partir de l'any 1962, el desenvolupament d'aquesta estratègia de purificació, basada en una etapa d'ultracentrifugació amb gradient de densitat creat amb clorur de cesi (CsCl) o clorur de rubidi (RbCl), ha permès l'obtenció de les quantitats necessàries de vectors adenovirals amb propòsits de recerca i per portar a terme les primeres proves *in vivo* amb animals, senzillament amb la recollida de les bandes aparegudes durant el procés i la posterior eliminació de traces tòxiques de cations rubidi (Rb⁺) o cations cesi (Cs⁺), mitjançant la circulació per gravetat a

través d'una columna de cromatografia.

El principal avantatge d'aquesta estratègia de purificació és la separació dels virions complets d'aquelles càpsides amb diferents graus de maduresa que no contenen DNA. El seu principal inconvenient, tal i com el seu nom indica, és la molt limitada possibilitat d'incrementar l'escala de treball: arribant-se a tractar com a màxim volums de l'ordre de litres amb unitats que requereixen un temps elevat per processar el contingut, esdevenen extraordinàriament costosos i són comunament poc disponibles, ja que es reserven per a l'enriquiment d'urani [61, 65].

2.5.2.2. Estratègia escalable

No va ser fins als anys 90, moment en què la teràpia gènica va guanyar protagonisme i la demanda de vectors adenovirals va augmentar, quan es va reactivar la necessitat de dissenyar noves estratègies de purificació basades en una sèrie d'operacions unitàries de filtració i cromatografia, les quals permetessin el tractament de tot el contingut d'un bioreactor, independentment de l'escala.

Un cop finalitzat el procés productiu, es realitza la lisi cel·lular, emprant diversos cicles consecutius de congelació i descongelació o bé per sonicació; les posteriors etapes de microfiltració permeten eliminar les restes cel·lulars, i la ultracentrifugació permet reduir els volums a tractar i condicionar la mostra per a les etapes de cromatografia en columna. Durant aquesta seqüència s'allibera una gran quantitat de DNA el qual pot atrapar partícules víriques, tot reduint el rendiment de purificació, obturant les membranes i afectant negativament el funcionament de les columnes de cromatografia. Per tant, és molt recomanable una etapa de tractament enzimàtic amb nucleases per a la degradació del DNA, tot i que es tracti d'un reactiu molt car.

Com a etapa clau de la purificació, s'han avaluat diversos tipus de cromatografia: cromatografia de bescanvi aniònic, d'interacció hidrofòbica, d'exclusió molecular (també coneguda com de gel-filtració), etc... La millora de les reïnes cromatogràfiques existents, realitzada partir de 1960, i la contínua aparició de noves, específicament dissenyades, permet actualment captar els virions amb més concentració i eluir-los amb uns rendiments força elevats.

A nivell industrial, pràcticament la majoria de processos de purificació es troben optimitzats utilitzant una etapa de cromatografia de bescanvi aniònic per capturar els virions, com a etapa principal, seguida d'una etapa de polit, normalment, una etapa de cromatografia d'exclusió molecular. El rendiment global del procés oscil·la entre el 30% i el 80%, ja que el nombre d'etapes de purificació és més alt que en l'estratègia no escalable, i no s'ha d'oblidar que moltes de les reïnes emprades foren inicialment dissenyades per a la separació de proteïnes i no per capturar adenovirus.

2.6. Normativa del bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals

2.6.1. Bones pràctiques de manufactura (GMP)

L'obtenció de biofàrmacs, entre els quals es troben els vectors adenovirals destinats a teràpia gènica, s'ha de realitzar conforme a la normativa GMP. És a dir, la implementació a nivell industrial de tot el bioprocés ha de garantir que, des de la preparació de l'inòcul cel·lular inicial fins a l'expedició del producte final, es disposa de la màxima qualitat i traçabilitat de qualsevol recurs emprat.

De forma general, s'ha d'entendre la normativa GMP com un seguit de recomanacions establertes per als fabricants (bio)farmacèutics per mantenir el control del bioprocés d'una forma adequada, consistent i reproducible. No existeix una única manera de complir amb aquestes normes, però en qualsevol cas s'han de seguir de forma que es garanteixi la qualitat, seguretat, eficiència i estabilitat del producte final, donada la seva aplicació clínica. El seu bon compliment forma part del procés d'aprovació del (bio)fàrmac per part de les agències reguladores. En concret, l'Agència Europea del Medicament (EMA) aconsella el seguiment de la norma Eudralex volum 4 que proveeix d'una guia per a la interpretació i aplicació de la normativa GMP. D'altra banda, també va publicar una guia específica sobre aquesta normativa aplicada a productes per a teràpia gènica [66].

L'aplicació de la normativa GMP a la fabricació de vectors adenovirals vol assegurar que els pacients sotmesos a proves clíniques no es trobin en situació de risc, i que els resultats d'aquestes no es vegin afectats per un procés de fabricació insatisfactori. Per aquesta raó, la complexitat inherent que té la implementació de tot bioprocés industrial, encara augmenta més.

Existeixen diversos aspectes sobre els quals s'apliquen les normes GMP:

- Procés: és necessari que sigui consistent d'un lot a un altre; per això, és obligatòria la traçabilitat de qualsevol acció que l'afecti.
- Instal·lacions: les operacions que configuren el procés s'efectuen en sales dissenyades per facilitar la seva neteja, amb equips de descontaminació (per exemple, autoclaus) i sistemes de subministrament d'aigua i aire independents. En funció del nivell de qualitat de l'aire, les sales es poden classificar en D, C, B o A, a mesura que augmenta la seva puresa, i per tant disminueix la possibilitat de contaminació creuada o disseminació per accident de l'adenovirus recombinant a l'ambient.
- Personal: ha de rebre la formació adequada i satisfer estrictament el nivell de responsabilitat exigida. Les normes de vestimenta, tant per a la protecció personal com per a la protecció del producte, són extraordinàriament rigoroses.
- Equipament: els requeriments afecten no només al seu disseny, sinó també a la seva preparació i operació. En quant a la preparació, un dels aspectes més crítics és el de la

neteja i l'esterilització prèvia a cada nou lot. En reactors de volums considerables, els efectes associats a les contaminacions poden ser extremadament negatius i encarir el procés, per això es doten els equips amb sistemes de neteja automàtica i exhaustiva *in situ* (CIP) i d'esterilització (SIP). En quant a l'operació, s'obliga al seguiment dels procediments normalitzats de treball (PNT) per assegurar que les corresponents accions són les correctes al llarg de tot el procés.

2.6.2. Tecnologia de bioprocés d'un sol ús

La tecnologia d'un sol ús ha impulsat definitivament l'aplicació o adopció de la normativa GMP en els bioprocessos a nivell industrial, simplificant, a més, el seu disseny i el de les noves instal·lacions on aquests tenen lloc. Els processos es visualitzen com un seguit d'unitats que s'adquireixen ja de forma estèril, llestes per connectar-se de forma asèptica i iniciar l'operació.

Per una banda, aquests elements d'un sol ús redueixen el cost d'inversió inicial; disminueixen el temps necessari per a la seva construcció i posterior validació; i redueixen la necessitat d'incorporar cars serveis auxiliars (per exemple, vapor d'alta pressió per als sistemes CIP i SIP). Això es tradueix, finalment, en instal·lacions molt versàtils i flexibles que poden arribar a donar cabuda a diferents processos per a l'obtenció de productes amb propietats que poden ser relativament diferents en les mateixes sales. És per això que les empreses subcontractades per obtenir el producte, les anomenades *Contract Manufacturing Organizations* (CMO), estan apostant fortament per aquesta nova aproximació. En general, els processos s'estalvien costoses validacions per ser aprovats, requereixen menys mà d'obra, són més segurs, es troben menys exposats a contaminacions externes i redueixen el temps total de cada lot, ja que minimitzen els períodes previs de preparació i arrencada.

Entre els seus principals desavantatges es troben l'encara relativament limitada escala operacional de centenars de litres de volum que tracten, encara que s'estan fent autèntics esforços en augmentar-la, i el cost associat al tractament i eliminació dels elements, una vegada finalitzada la seva utilització, amb el consegüent impacte mediambiental.

A continuació es descriu quin efecte té l'aplicació d'aquesta nova tecnologia en les etapes productiva i de purificació.

2.6.2.1. Producció

En el terreny del procés de producció, l'aparició dels bioreactors d'un sol ús com a sistemes de cultiu no convencionals ha marcat un abans i després. Essencialment, el concepte principal en el que es basen aquests nous equips consisteix en què el cos principal del bioreactor, la cambra de cultiu, és una bossa de plàstic biocompatible i, consegüentment d'un sol ús, la qual es compra ja preesterilitzada per radiació i totalment llesta per fer-se servir. Les peces auxiliars com les sondes són reutilitzables.

Existeixen fonamentalment dos grans grups d'aquests sistemes de cultiu. El primer es basa en l'agitació de la cambra de cultiu sense que cap element mecànic es trobi al seu interior. El

bioreactor pioner d'aquest tipus és l'anomenat *Wave Bioreactor* (GE Healthcare), desenvolupat inicialment per Wave Biotech l'any 1997, però amb una creixent implantació en els darrers anys. En aquest, la bossa de plàstic se situa sobre una plataforma on es manté un moviment basculant continu, la qual cosa genera l'aparició d'ones sobre la superfície del medi. Gràcies a aquestes s'homogeneïtza el contingut de la bossa i, al mateix temps, s'aporta la transferència òptima d'oxigen a la interfase gas-líquid per al cultiu de cèl·lules animals (veure Figura 2.20). Actualment existeixen diverses empreses que han desenvolupat i comercialitzen bioreactors d'un sol ús similars a l'anterior, basats en el mateix concepte, per exemple el model Appliflex (Applikon). En quant al volum que poden assolir les bosses, en l'actualitat se situa al voltant dels 500 L de líquid.



Figura 2.20. Tipus de bioreactors d'un sol ús (*Wave Bioreactor*) amb diferents volums operacionals.

El segon tipus de bioreactors d'un sol ús, més recent, ha estat el dissenyat i impulsat per les companyies Xcellerex, Hyclone i Sartorius Stedim Biotech (veure Figura 2.21), basat en mantenir el concepte de tanc agitat, tot i que amb una bossa de plàstic que se situa en l'interior d'una carcassa metàl·lica, la qual en manté la forma i suporta la pressió exercida pel líquid. L'agitació es realitza mitjançant un element mecànic de pales d'un sol ús. Aquestes unitats poden abraçar volums operacionals superiors als anteriors, de fins a 1.000 L.



Figura 2.21. Bioreactors d'un sol ús de tanc agitat: a) Hyclone (S.U.B.); b) Xcellerex; c) BIOSTAT Cultibag STR 200.

2.6.2.2. Purificació

Pel que fa al procés de purificació, tots els elements de filtració i columnes cromatografia ja es disposen com a tecnologia d'un sol ús: condicionades en les solucions adequades i preparades per ser emprades tot just després de ser adquirides. En aquest sentit, la línia de productes ReadyToProcess (GE Healthcare) està tenint aplicació a escala industrial amb columnes prereblertes de fins a 20 L (veure Figura 2.22).



Figura 2.22. Columnes de cromatografia d'un sol ús.

Com a conclusió, encara que és difícil establir un criteri general, es pot considerar que els equips d'un sol ús consisteixen en una alternativa molt adient i factible, en concret per al bioprocés d'obtenció de vectors adenovirals, el qual requereix volums moderats, capacitats de producció flexibles i s'ha de mantenir sota estrictes condicions d'operació GMP.

En el present treball s'intenta dissenyar un bioprocés íntegre per a l'obtenció de vectors adenovirals, el qual maximitzi la quantitat de producte final: començant per l'estudi de diverses línies cel·lulars productores i la interacció amb el vector; continuant amb la caracterització del procés de producció que consistirà en avaluar i comparar els diferents sistemes i estratègies de producció i, finalment, posant a punt les estratègies de purificació. Aquesta informació pretén establir les bases per al disseny i l'anàlisi del bioprocés implementat a escala industrial, tot considerant les implicacions que requereix el compliment de la normativa GMP.

2.7. Bibliografia

1. Roche. 2006. *Biotechnology. New directions in medicine*. F. Hoffmann - La Roche Ltd.
2. Hu, W.S. and Dodge, T.C. 1985. *Cultivation of mammalian cells in bioreactors*. *Biotechnology progress* 1: 209-215.
3. Ozturk, S.S. and Hu, W.S. 2005. *Cell Culture Technology For Pharmaceutical And Cell-based Therapies*: Taylor & Francis Group p.
4. PhRMA. 2008. *Medicines in development: Biotechnology*. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America.
5. Gad, S.C. 2007. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*. 1st ed. New York (NY): John Wiley & Sons Inc. 1659 p.
6. Edelstein, M.L., Abedi, M.R. and Wixon, J. 2007. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update*. *The Journal of Gene Medicine* 9(10): 833-842.
7. Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y. and Tolstoshev, P. 1995. *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years*. *Science* 270(5235): 475-480.
8. Zabner, J., Couture, L.A., Gregory, R.J., Graham, S.M., Smith, A.E. and Welsh, M.J. 1993. *Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis*. *Cell* 75: 207-216.
9. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M. and Batshaw, M.L. 2003. *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. *Molecular Genetics and Metabolism* 80(1-2): 148-158.
10. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Basile, G.S., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S. and Casanova, J.L. 2000. *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. *Science* 288(5466): 669-672.
11. Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Köhlcke, K., Schilz, A. and Kunkel, H. 2006. *Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1*. *Nature medicine* 12: 401-409.
12. Peng, Z. 2005. *Current Status of Gene Therapy in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers*. *Human Gene Therapy* 16(9): 1016-1027.
13. Bergeron, B.P. and Chan, P. 2004. *Biotech industry: a global, economic, and financing overview*. 1st ed. New York (NY): John Wiley & Sons Inc. 368 p.
14. Mountain, A. 2000. *Gene therapy: the first decade*. *Trends in Biotechnology* 18(3): 119-128.

15. Narvaiza, I., Mazzolini, G., Qian, C., Prieto, J. and Melero, I. 2003. *Vectores adenovirales de primera generaci3n, el vector por excelencia en inmunoterapia g3nica del c3ncer*. *Inmunología* 22(2): 225-242.
16. Lundstrom, K. 2003. *Latest development in viral vectors for gene therapy*. *Trends in Biotechnology* 21(3): 117-122.
17. Groves, M.J. 2006. *Pharmaceutical Biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton (FL): Taylor & Francis Group. 411 p.
18. Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. and Jani, A. 1992. *Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle*. *Human Molecular Genetics* 1(6): 363-369.
19. Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S. and Vogel, J.C. 1995. *Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA*. *Nature Genetics* 10(2): 161-166.
20. Alton, E., Geddes, D.M., Gill, D.R., Higgins, C.F., Hyde, S.C., Innes, J.A. and Porteous, D.J. 1998. *Towards gene therapy for cystic fibrosis: a clinical progress report*. *Gene Therapy* 5(3): 291-292.
21. Davies, J.C., Geddes, D.M. and Alton, E. 1998. *Prospects for gene therapy for cystic fibrosis*. *Molecular Medicine Today* 4(7): 292-299.
22. Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. and Birnstiel, M.L. 1990. *Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(9): 3410-3414.
23. Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M. and Greaves, R.F., *A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1491aa is replication defective due to a failure in autoregulation*. 1996. *National Acad Sciences*. 11321-11326.
24. Robertson, E.S., Ooka, T. and Kieff, E.D., *Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes*. 1996. *National Acad Sciences*. 11334-11340.
25. Scrimanti, C.R. and Calos, M.P. 1998. *Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer*. *Current Opinion in Biotechnology* 9(5): 476-479.
26. Moss, B., *Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety*. 1996. *National Acad Sciences*. 11341-11348.
27. Frolov, I., Hoffman, T.A., Pragai, B.M., Dryga, S.A., Huang, H.V., Schlesinger, S. and Rice, C.M., *Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications*. 1996. *National Acad Sciences*. 11371-11377.
28. Feng, M., Jackson, W.H., Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Siegal, G. and Curiel, D.T. 1997. *Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector*. *Nature Biotechnology* 15(9): 866-870.

29. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J. 1993. *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences 90(17): 8033-8037.
30. Segura, M.M., Kamen, A., Trudel, P. and Garnier, A. 2005. *A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography*. Biotechnology and bioengineering 90(4): 391-404.
31. Vigna, E. and Naldini, L. 2000. *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy*. The Journal of Gene Medicine 2(5): 308-316.
32. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H. and Verma, I.M. 1997. *Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors*. Nature Genetics 17(3): 314-317.
33. Logan, A.C., Lutzko, C. and Kohn, D.B. 2002. *Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells*. Current Opinion in Biotechnology 13(5): 429-436.
34. Rabinowitz, J.E. and Samulski, J. 1998. *Adeno-associated virus expression systems for gene transfer*. Current Opinion in Biotechnology 9(5): 470-475.
35. Boris-Lawrie, K.A. and Temin, H.M. 1993. *Recent advances in retrovirus vector technology*. Current opinion in genetics & development 3(1): 102-109.
36. Rowe, W., Huebner, R. and Gillmore, L. 1953. *Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue cultures*. Proceedings of the Society of Experimental Biology Medicine 84: 570-573.
37. Oliver, C.J., Shortridge, K.F. and Belyavin, G. 1976. *Diffusion coefficient and molecular weight of type 5 adenovirus by photon-correlation spectroscopy*. Biochimica et biophysica acta 437(2): 589-598.
38. Bernaola, G. and Luque, W. 2001. *Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus*. Paediatrica 4(2): 41-47.
39. Curiel, D. and Douglas, J.T. 2002. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*. 1st ed. San Diego (CA): Academic Press. 677 p.
40. Alba, R., Bosch, A. and Chillon, M. 2005. *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy*. Gene Therapy 12(Suppl 1): S18-S27.
41. Hakkarainen, T. and Hemminki, A. 2005. *Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes*. Gene Therapy and Molecular Biology 9: 153-168.
42. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. and Finberg, R.W. 1997. *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science 275(5304): 1320-1323.

43. Mentel, R., Dopping, G., Wegner, U., Seidel, W., Liebermann, H. and Dohner, L. 1997. *Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes*. Journal of medical virology 51(3): 252-257.
44. Russell, W.C. 2000. *Update on adenovirus and its vectors*. Journal of General Virology 81(11): 2573-2604.
45. Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A. and Webster, A. 1995. *Molecular interactions during adenovirus DNA replication*. Current topics in microbiology and immunology 199(2): 31-48.
46. Wold, W.S. and Gooding, L.R. 1991. *Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions*. Virology 184(1): 1.
47. Leppard, K.N. 1997. *E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections*. Journal of General Virology 78(9): 2131-2138.
48. Danthinne, X. and Imperiale, M.J. 2000. *Production of first generation adenovirus vectors: a review*. Gene Therapy 7: 1707-1714.
49. Wivel, N.A., Gao, G.P. and Wilson, J.M. 1999. *Adenovirus vectors: the development of human gene therapy*. The development of human gene therapy. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 87-110.
50. Fang, B., Wang, H., Gordon, G., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Woo, S.L.C. and Eisensmith, R.C. 1996. *Lack of persistence of E 1 ?-? recombinant adenoviral vectors containing a temperature-sensitive E 2 A mutation in immunocompetent mice and hemophilia B dogs*. Gene therapy(Basingstoke) 3(3): 217-222.
51. Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L. and Kochanek, S. 1998. *Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity*. Nature Genetics 18(2): 180-183.
52. Biosciences, A. 2005. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*. 1st ed. Uppsala: GE Healthcare. 172 p.
53. Biosciences, A. 2000. *Microcarrier Cell Culture: Scale-Up Methods*. 1st ed. Uppsala: Amersham Biosciences AB. 28 p.
54. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. 1977. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology 36(1): 59-72.
55. Lochmuller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G. and Acsadi, G. 1994. *Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (?E1+ ?E3) during multiple passages in 293 cells*. Human Gene Therapy 5(12): 1485-1491.

56. Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., van Ormondt, H., Hoeben, R.C. and van der Eb, A.J. 1996. *Characterization of 911: A New Helper Cell Line for the Titration and Propagation of Early Region 1-Deleted Adenoviral Vectors*. Human Gene Therapy 7(2): 215-222.
57. Assoian, R.K. 1997. *Anchorage-dependent cell cycle progression*. Journal of Cell Biology 136(1): 1-4.
58. Garnier, A., Côté, J., Nadeau, I., Kamen, A. and Massie, B. 1994. *Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells*. Cytotechnology 15(1-3): 145-155.
59. Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J.M., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H. and van der Eb, A.J. 1998. *New Helper Cells and Matched Early Region 1-Deleted Adenovirus Vectors Prevent Generation of Replication-Competent Adenoviruses*. Human Gene Therapy 9(13): 1909-1917.
60. Lecina, M. 2007. *Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
61. Altaras, N.E., Aunins, J.G., Evans, R.K., Kamen, A., Konz, J.O. and Wolf, J.J. 2005. *Production and formulation of adenovirus vectors*. Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260.
62. Nadeau, I., Garnier, A., Côté, J., Massie, B., Chavarie, C. and Kamen, A. 1996. *Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies*. Biotechnology and bioengineering 51(6): 613-623.
63. Wu, S.C., Huang, G.Y.L. and Liu, J.H. 2002. *Production of Retrovirus and Adenovirus Vectors for Gene Therapy: A Comparative Study Using Microcarrier and Stationary Cell Culture*. Biotechnology progress 18(3): 617-622.
64. Nadeau, I. and Kamen, A. 2003. *Production of adenovirus vector for gene therapy*. Biotechnology advances 20(7-8): 475-489.
65. Konz, J.O., Livingood, R.C., Bett, A.J., Goerke, A.R., Laska, M.E. and Sagar, S.L. 2005. *Serotype specificity of adenovirus purification using anion-exchange chromatography*. Human Gene Therapy 16(11): 1346-1353.
66. EMEA. 2003. *Concept paper on development of Good Manufacturing Practices Guidance of Gene Therapy and Somatic Cell Therapy Medicinal Products*.

3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

Com ja s'ha comentat en el capítol anterior, l'objectiu principal que es pretén assolir en aquest treball és la configuració i el desenvolupament íntegre d'un bioprocés eficient, reproducible i escalable per a l'obtenció de vectors adenovirals per a teràpia gènica que maximitzi la quantitat i garantitzi la qualitat del producte final. Per tal d'assolir-lo és necessari dissenyar el bioprocés en vistes a facilitar el compliment dels estàndards que imposa la normativa GMP (*Good Manufacturing Practices*).

L'elaboració d'aquest treball es divideix, doncs, en quatre parts ben diferenciades: un primer bloc on s'estudien les línies cel·lulars productores i la seva interacció amb el vector adenoviral, un segon bloc on s'apliquen els coneixements adquirits per al desenvolupament de l'etapa de producció, un tercer bloc on es desenvolupen les possibles estratègies de purificació amb la configuració de les diverses etapes i, finalment, un quart on es plasma tota la informació en forma de diferents alternatives, les quals s'analitzen en un context econòmic d'implantació a escala industrial, per poder concloure sobre el grau de rendibilitat i de viabilitat de cadascuna.

El pla de treball que es planteja dins de cadascuna d'aquestes parts és el següent:

1. Bloc d'estudis previs:

- Seleccionar la línia cel·lular productora òptima i avaluar els medis i les condicions de cultiu més escaients que afavoreixin el seu creixement.
- Examinar la interacció entre la línia cel·lular i el vector adenoviral, i establir els paràmetres claus d'infectivitat.

2. Bloc de producció:

- Estudiar les diferents alternatives de monitoratge i seleccionar-ne la més adequada per supervisar, en línia i en temps real, l'etapa de producció de forma senzilla i robusta.
- Estudiar les diferents estratègies de producció i seleccionar-ne aquelles que presenten més avantatges en un entorn industrial.
- Integrar els punts previs en la posada a punt dels sistemes de producció que maximitzin el rendiment de la producció i complementar-los amb la utilització d'eines de control per poder gestionar els equips, a partir de la interpretació de les mesures utilitzades.

3. Bloc de purificació:

- Estudiar les estratègies de purificació aplicables, configurar-ne les etapes que les conformen i establir les condicions d'operació òptimes per a cadascuna.
- Caracteritzar la qualitat del producte final obtingut.

4. Bloc d'anàlisi de procés:

- Organitzar la informació generada en els blocs anteriors en forma d'alternatives implementables a escala industrial per comparar-les i seleccionar-ne la més rendible, considerant els aspectes econòmics.

4. ESTUDIS PREVIS

4. ESTUDIS PREVIS

Com s'ha comentat en la introducció, la major competitivitat econòmica i predomini en el mercat d'un determinat procés d'obtenció de vectors adenovirals per a teràpia gènica depèn, no només de les etapes pròpiament dites de producció i purificació, sinó que indefectiblement també ho fa de tot un seguit d'etapes de desenvolupament prèvies. Aquestes es poden allargar considerablement en el temps i esdevenir molt costoses, però com a contrapartida, proporcionen un coneixement bàsic i exhaustiu dels principals elements biològics (vector i línia cel·lular productora), el qual resultarà cabdal per al posterior disseny integral de les següents etapes de producció i purificació (descrites en propers capítols), i influirà de forma decisiva en aspectes tan crítics com l'economia del bioprocés.

Com a punt de partida del present treball, ja es disposa del producte que es vol obtenir (el vector adenoviral) i d'un ventall de cèl·lules productores candidates, fruit de la col·laboració amb el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG). Aquest fet fa que no calgui afrontar les fases de desenvolupament més preliminars, centrades en l'ús d'eines de biologia molecular, i relacionades amb el disseny genètic i l'elaboració tant del vector adenoviral com del biocatalitzador on es produirà.

Per tant, aquest capítol situa els seus principals objectius en analitzar i caracteritzar el comportament de les diferents línies cel·lulars productores disponibles, així com la seva capacitat de producció d'adenovirus recombinants en cultiu, per posteriorment escollir-ne el candidat més adequat.

4.1. Caracterització de la línia cel·lular productora

Entre les múltiples línies cel·lulars ressenyades al llarg de la introducció, pel seu elevat grau d'utilització en la producció de vectors adenovirals i per la seva facilitat d'adquisició, la HEK293 és la que s'utilitza en el present treball. Provenint de teixit renal d'embrió humà i modificada genèticament per expressar la regió E1 del genoma del Ad5 humà [1], la possibilitat que ofereix aquesta cèl·lula de disposar de dos fenotips diferents, adherent i no adherent, obre un ventall més ampli d'opcions sobre el procés global que tot seguit es discuteixen i valoren.

En aquest sentit, la caracterització de la cèl·lula productora, ja sigui adherent o no adherent, passa per la posada a punt de les tècniques de cultiu necessàries per al seu creixement: la selecció de les condicions, sistemes i medis de cultiu òptims, així com la determinació dels paràmetres cinètics més importants com són la velocitat específica de creixement i el temps de duplicació [2].

4.1.1. Línia cel·lular adherent

El comportament originari de la cèl·lula HEK293, basat en el seu creixement en adherència, resulta lògic d'establir-lo com una referència davant d'alternatives cel·lulars, donat que bona part de les seves condicions de cultiu es troben molt ben optimitzades. Tot i això, aquest fet pot dificultar l'acompliment de les directrius GMP. Sense anar més lluny, tal i com es descriu a continuació, el medi de cultiu conté una formulació amb components difícilment validables. No obstant, aquest tipus cel·lular continua essent un element de comparació molt útil i exigent davant possibles alternatives com, per exemple, les de tipus no adherent.

És en aquest context, on el factor que guanya més rellevància en el procés d'optimització és el sistema de cultiu. Atenent les característiques de la línia cel·lular i les tècniques de cultiu disponibles, sorgeix la possibilitat de desenvolupar el cultiu tant en un sistema agitat, com no agitat. Primerament, però, és necessari descriure el medi de cultiu emprat per cultivar la línia cel·lular.

4.1.1.1. Medi de cultiu

El medi basal de referència és el DMEM, la composició del qual és completament definida. La seva formulació disposa de fonts principals de carboni i nitrogen, com la glucosa i la glutamina, una mescla equilibrada de sals minerals que permeten mantenir el pH i la pressió osmòtica en condicions fisiològiques, i un gran nombre d'aminoàcids i vitamines que la cèl·lula no està capacitada per produir per sí mateixa. En aquest sentit, cal fer menció especial al suplement més característic del medi de cultiu: el sèrum.

Bàsicament, el sèrum és el sobrenedant on es troba present la sang coagulada. Conté una mescla molt complexa, i moltes vegades poc definida, de compostos que faciliten l'adhesió de la cèl·lula, elements traça, factors de creixement, hormones, etc..., els quals intervenen en el creixement cel·lular. En moltes ocasions, els requeriments nutricionals de la cèl·lula són tan

dependents del sèrum, que cal suplementar el medi de cultiu amb un interval de concentracions que oscil·la des del 1% fins al 20% (v/v) si es vol observar proliferació [3, 4]. Es pot obtenir de diverses fonts, normalment d'origen animal. Els tipus més emprats en el cultiu cel·lular són el sèrum fetal de vedella (FCS) o el sèrum fetal boví (FBS).

En concret, l'utilitzat en el cultiu de la línia cel·lular adherent HEK293 és el FBS addicionat al medi DMEM amb una proporció de 10% (v/v).

4.1.1.2. Sistema de cultiu no agitat

Com a punt de partida, amb l'objectiu inicial d'extreure informació bàsica per conèixer els paràmetres crítics del cultiu adherent, i d'establir els protocols òptims de treball, és necessari l'estudi en un sistema de cultiu no agitat, el més senzill possible. Entre les possibilitats de producció adherent, descrites a l'apartat 2.5.1.2 de la introducció, els sistemes basats en la utilització de flascons de cultiu (*T-flask*), dissenyats simplement per fer-se servir en incubadors de CO₂, són idonis per portar a terme aquesta tasca.

D'aquesta manera, l'experiment es desenvolupa en flascons de cultiu de 25 cm² (TPP) especialment tractats per afavorir l'adherència superficial, amb un volum de 10 mL de medi DMEM 10% FBS. Aquests se situen a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 5%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. La concentració d'inòcul és de 0,5·10⁵ cell/mL. La Figura 4.1 mostra el perfil de concentració cel·lular, la seva obtenció implica la manipulació de totes i cadascuna de les mostres per desancorar les cèl·lules de la superfície i, seguidament, emprar el protocol de recompte de cèl·lules viables mitjançant la tinció de blau de tripà (veure apartat 9.7.1.1 del capítol de materials i mètodes).

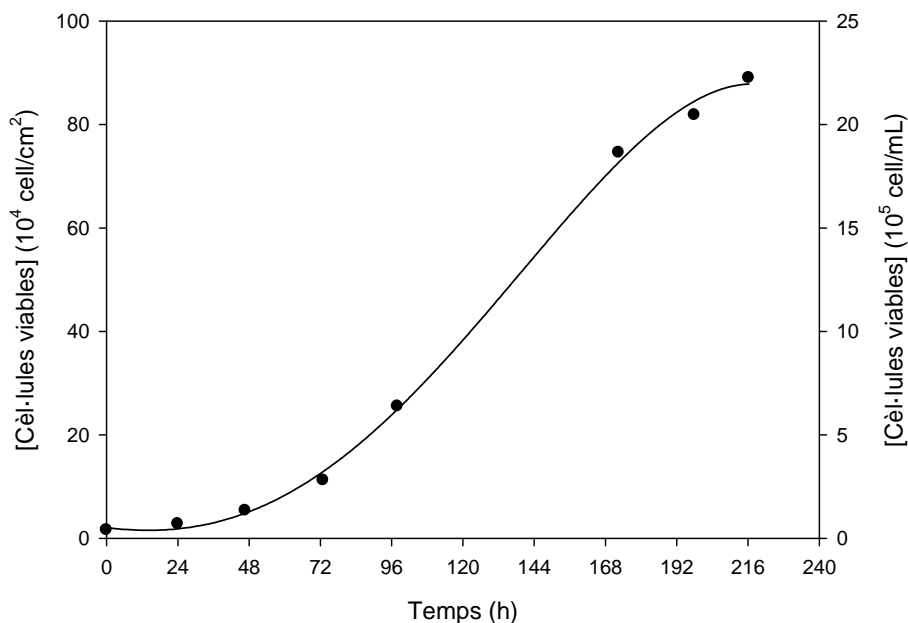


Figura 4.1. Perfil de concentració de cèl·lules viables de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu no agitat.

Segons es pot observar, el perfil de creixement cel·lular durant la fase exponencial es perllonga fins a les 172 h, amb una concentració cel·lular de $74,6 \cdot 10^4$ cell/cm² ($18,6 \cdot 10^5$ cell/mL). A partir d'aquest moment, disminueix ostensiblement la velocitat de creixement del cultiu. Aquest sobtat alentiment podria estar relacionat amb algun tipus de limitació i/o inhibició dels components presents al brou de cultiu; tanmateix, la causa també es podria trobar en una limitació de l'àrea de colonització disponible.

Qualsevol cultiu adherent, quan ocupa la totalitat de l'àrea assoleix una situació anomenada de confluència. Arribats a aquest moment, en funció del tipus cel·lular, el cultiu pot presentar dues respostes principals, sempre i quan no hi hagi limitació de nutrients: aturar la seva proliferació, si existeix inhibició per contacte cel·lular, o bé continuar-la amb un ritme més baix i donar lloc a una situació anomenada de superconfluència, la qual es caracteritza per la formació de múltiples capes de cèl·lules superposades, la qual cosa afecta negativament l'adhesió de noves cèl·lules i, globalment, redueix la velocitat de creixement.

Davant d'aquests fenòmens i, donat que l'àrea pot esdevenir el factor limitant del creixement en adherència, resulta fonamental determinar la concentració cel·lular adherent no només en unitats referides al volum del cultiu (cell/mL), les quals proporcionen dades molt útils si s'han de comparar resultats amb les de línies cel·lulars que creixen en suspensió, sinó també i fonamentalment cal fer-lo en unitats referides a la superfície disponible (cell/cm²).

Per tal de caracteritzar quantitativament la informació de la corba de creixement del cultiu, i comparar-la amb posteriors experiments, és necessari determinar els principals paràmetres cinètics corresponents a la fase de creixement exponencial, com són la velocitat específica de creixement màxima i el temps de duplicació.

Pel que fa a la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{\text{màx}}$), el seu valor es calcula a partir de l'Equació 4.1, extreta del balanç de matèria per a la concentració cel·lular durant la fase de creixement exponencial.

$$\text{Ln}(X_V) = \text{Ln}(X_{V,0}) + \mu_{\text{màx}} \cdot (t - t_0)$$

Equació 4.1. Expressió per al càlcul de la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{\text{màx}}$), on: X_V és la concentració de cèl·lules viables, $X_{V,0}$ és la concentració de cèl·lules viables inicial, t és el temps, t_0 és el temps inicial.

El temps de duplicació, definit com aquell moment on la proliferació cel·lular dobla el seu valor, s'obté a partir de l'expressió anterior substituint en aquesta $X_V = 2 \cdot X_{V,0}$ i $t = t_{\text{dupl}}$. Si es fa això, s'obté la següent expressió:

$$t_{\text{dupl}} = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu_{\text{màx}}}$$

Equació 4.2. Expressió per al càlcul del temps de duplicació (t_{dupl}), on; ($\mu_{\text{màx}}$) és la velocitat específica de creixement màxima.

Ambdós paràmetres calculats per al sistema de cultiu no agitat es recullen a la Taula 4.1, i es troben dins del rang típic de les línies cel·lulars productores d'adenovirus (entre 24 h i 30 h) publicats en altres treballs [5].

Sistema de cultiu	Paràmetres cinètics	
	$\mu_{\text{màx}}$ (h^{-1})	t_{dupl} (h)
No agitat	0,0284	24

Taula 4.1. Paràmetres cinètics de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu no agitat.

D'altra banda, i considerant que el principal objectiu del present treball és el desenvolupament del procés a escala productiva, esdevé indispensable posar en pràctica algun mètode de mesura indirecte per al seguiment del cultiu. Aquest ha de confirmar el creixement cel·lular, tot estalviant la laboriosa manipulació de les mostres per obtenir el recompte cel·lular, el qual pot resultar difícilment representatiu de la producció, sobretot a mesura que augmenti l'escala del bioprocés. Relacionat amb aquest aspecte i com es veurà en el següent capítol, l'elecció de les variables sobre les quals se sustenti un sistema de monitoratge robust i fiable esdevé un factor fonamental per al bioprocés, un cop es decideixi la línia cel·lular productora i el sistema productiu més adients.

Tradicionalment, la mesura indirecta es basa en la determinació de les concentracions dels principals substrats i/o subproductes derivats de l'activitat metabòlica del biocatalitzador. En aquest sentit, l'oxigen apareix en primer lloc com un dels principals nutrients a considerar, degut fonamentalment a dues raons: la primera és la seva importància cabdal en el metabolisme cel·lular, essent l'acceptor final d'electrons a la cadena respiratòria mitocondrial, i la segona raó és la seva baixa solubilitat en el medi de cultiu, aproximadament de 7 mg/L, la qual cosa el fa ser ferm candidat limitant en el cultiu [3, 6, 7]. No obstant, degut al fet que la seva mesura en sistemes de cultiu normalment queda restringida a entorns més controlats com els bioreactors, tal i com es veurà en el capítol de producció, la relació àrea del sistema de cultiu respecte volum de líquid ($25 \text{ cm}^2/10 \text{ mL}$) en els experiments previs s'escull com perquè l'oxigen transferit a través de la superfície de líquid sempre es mantingui en excés per suplir les necessitats del cultiu.

Eliminat l'oxigen com a possible variable per ésser mesurada, resta la determinació de metabòlits dissolts en el medi de cultiu, els quals també juguen un paper molt important en l'activitat del biocatalitzador. D'entre aquests, destaca la glucosa, com a principal substrat a la majoria de formulacions emprades en el cultiu de cèl·lules animals, i el lactat, principal subproducte del metabolisme cel·lular. La seva determinació es realitza mitjançant analitzadors enzimàtics (veure apartat 9.7.3 del capítol de materials i mètodes).

El perfil de concentració d'ambdós components al llarg del cultiu en adherència es pot apreciar a la Figura 4.2 a continuació.

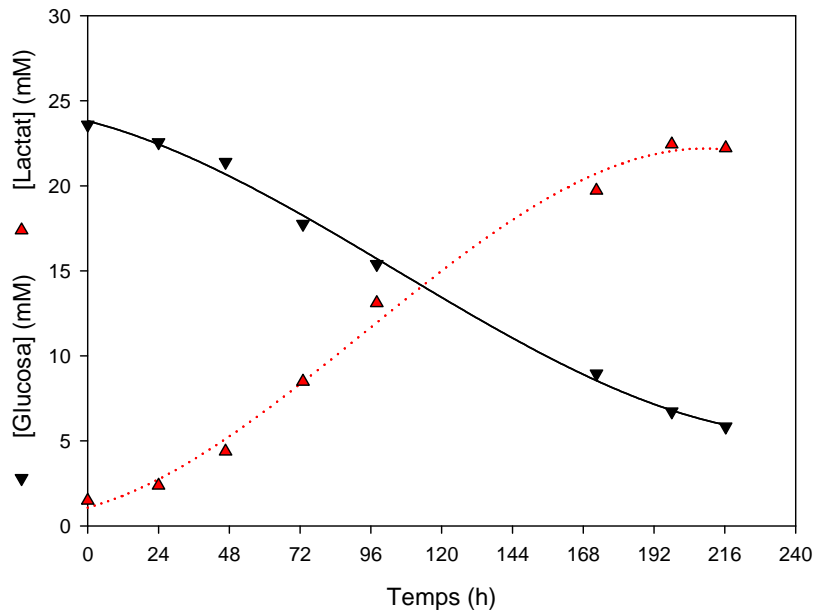


Figura 4.2. Perfil de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu no agitat.

S'observa com la major variació en els perfils de concentració d'ambdós metabòlits coincideix amb la fase de creixement exponencial prèviament descrita (entre les 48 h i les 172 h de cultiu), donat que les cèl·lules es troben molt actives proliferant i colonitzant l'àrea disponible.

Com s'ha esmentat anteriorment, el cultiu assoleix algun tipus de limitació a partir de les 172 h. Aquesta no es relaciona amb la concentració de glucosa que és de 8,9 mM, encara en excés al medi en aquell instant. Pel que fa al lactat, la concentració del qual és de 19,7 mM, Nadeau i col. publiquen que per a la línia cel·lular HEK293 es comencen a advertir fenòmens d'inhibició en la proliferació a partir d'un valor de 20 mM [8], límit superat lleugerament només al final de l'experiment (22,2 mM). Per tant, podrien existir altres components en el medi de cultiu que juguessin un paper limitant, com per exemple la glutamina.

Davant la insuficient quantitat d'informació per dilucidar quin és el factor limitant en el creixement a partir de les 172 h de cultiu, es decideix plantejar un nou experiment idèntic a l'anterior, però amb un recanvi total de medi en el moment on s'observa la limitació. Els perfils superposats de creixement i de metabòlits es mostren a la Figura 4.3.

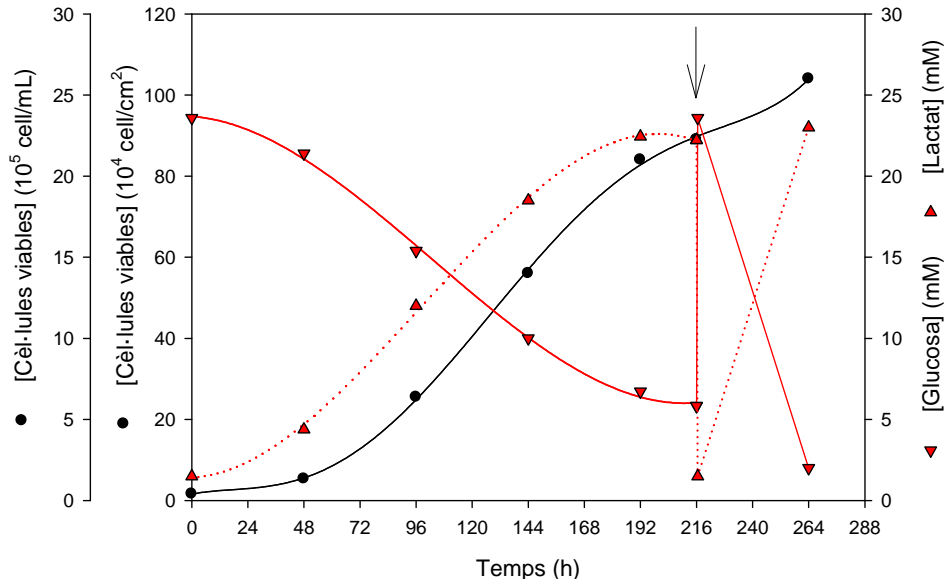


Figura 4.3. Perfil de concentració de cèl·lules viables (●) i dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu no agitat amb recanvi de medi. La sageta indica el moment de l'actuació.

El comportament de les corbes és molt similar a l'observat en la Figura 4.1 i la Figura 4.2. En el moment del recanvi total de medi dut a terme a les 216 h de cultiu, la concentració de cèl·lules viables és de $89,1 \cdot 10^4$ cell/cm² ($22,4 \cdot 10^5$ cell/mL); 48 h després la tendència de la corba de creixement canvia i la concentració final augmenta assolint un valor final de $104,6 \cdot 10^4$ cell/cm² ($26,1 \cdot 10^5$ cell/mL).

Amb les dades esmentades, es pot concloure que el recanvi amb medi fresc permet a les cèl·lules continuar el seu creixement i ocupar l'àrea en una situació de superconfluència. Per tant, la limitació observada es deu a algun component limitant o inhibitori present al brou de cultiu a determinar, si fos necessari, mitjançant anàlisis suplementàries més exhaustives.

4.1.1.3. Sistema de cultiu agitat: cultiu sobre microsuports

En l'apartat anterior, s'ha utilitzat el mètode més simple caracteritzar el cultiu de la línia cel·lular adherent HEK293, basat en un dels sistemes sense agitació, com és el *T-flask*. Històricament, aquests han estat i continuaran sent molt utilitzats per obtenir, prèvia infecció, reduïdes quantitats de vectors adenovirals.

No obstant, en el context actual d'increment a la demanda de vectors adenovirals per fer front a noves proves clíniques, aquests sistemes tradicionalment emprats no resulten gens competitius de cara a fer front a un augment d'escala del procés, ja que principalment requereixen costos de manteniment molt considerables (en personal i material fungible), i un important nombre de manipulacions, del que se'n deriva un risc potencial de contaminació elevat. Els sistemes de cultiu agitats, com ara els bioreactors de tanc agitat, resulten molt més adients per assolir l'objectiu del canvi d'escala, degut a la seva major reproductibilitat operacional i homogeneïtat en les condicions del cultiu.

Per tant, resulta necessari adequar els sistemes agitats a la proliferació de cèl·lules adherents com la HEK293. En aquest sentit, els microsuports són l'opció més apropiada.

Com s'ha definit en l'apartat 2.5.1.2 de la introducció, els microsuports estan formats per partícules microscòpiques individuals, anomenades perles, que proporcionen l'àrea d'ancoratge ideal, perquè la línia cel·lular adherent creixi, i al mateix temps es pugui mantenir en suspensió. Cada perla s'estructura entorn a una matriu que pot presentar múltiples geometries i materials de fabricació. Sobre la seva superfície, es troba un recobriment específic, segons el tipus de microsuport.

Inicialment desenvolupats per Van Wezel l'any 1967 a partir de reïnes dissenyades per a la cromatografia de bescanvi iònic [9], actualment, aquesta alternativa de cultiu continua sent objecte de molts esforços en R+D amb la finalitat de trobar materials innovadors i configuracions que millorin l'adherència i el creixement de la cèl·lula. A més, es troba àmpliament estesa en el camp de la profilaxi humana i animal, amb la producció de vacunes recombinants [10-13], així com de proteïnes terapèutiques [14-16]. Recentment, s'ha començat a emprar en estudis per a la producció de vectors virals per a teràpia gènica [17-20].

4.1.1.3.1. Característiques del cultiu sobre microsuports

El procés de colonització cel·lular superficial del microsuport es pot descriure com la combinació de dos processos fonamentals: el procés inicial d'adsorció de la cèl·lula a la superfície i el procés d'ancoratge i expansió cel·lular pròpiament dit. Entre els dos es reparteixen les quatre etapes generals de l'adherència cel·lular (adsorció, contacte, unió i proliferació):

- El procés d'adsorció es basa en les interaccions de tipus físic entre les proteïnes de membrana i la superfície del microsuport. En ocasions, una cèl·lula inicialment adsorbida pot desadsorbir-se del microsuport sense haver desenvolupat el procés d'adhesió real; per tant, la superfície ha d'oferir un elevat grau d'afinitat com perquè les cèl·lules es mantinguin el suficient temps unides per iniciar l'ancoratge real. És per aquesta raó que la majoria de microsuports es troben tractats mitjançant algun tipus de procediment, com per exemple la descàrrega elèctrica de corona, que activa la seva superfície amb càrregues positives, facilitant les interaccions de tipus electrostàtic amb les proteïnes de membrana carregades negativament. D'altra banda, les perles també poden presentar algun tipus de recobriment amb proteïnes específiques que intenten emular les condicions d'adherència *in vivo*; aquest és el cas del tractament amb fibronectina, col·lagen o laminina [21].

Durant el procés d'inoculació cel·lular, resulta essencial que la velocitat d'adsorció al microsuport sigui prou ràpida com per evitar la tendència natural de qualsevol cèl·lula adherent per unir-se amb sí mateixa i formar agregats pluricel·lulars. Aquests no són desitjables, ja que redueixen la potencialitat individual de cadascuna de les cèl·lules, tant per colonitzar noves partícules de microsuport, com per ésser infectades, arrel dels impediments estèrics creats.

- El procés d'adhesió i expansió cel·lular és de caire biològic i implica la formació d'enllaços entre receptors d'adhesió transmembrana, com les cadherines i les integrines, i els elements d'adhesió situats a la superfície del microsuport. Es produeixen canvis al domini citoplasmàtic dels receptors, la qual cosa provoca la difusió dels que es troben lliures i la posterior acumulació d'aquests sobre la superfície de contacte. Aquest fet es tradueix en un canvi de la morfologia cel·lular: la cèl·lula abandona la seva forma esfèrica original i passa a ser més allargada tot augmentant la seva àrea de contacte [22, 23]. Finalment, la proliferació cel·lular implica la interacció entre microtúbuls, filaments d'actina i receptors d'adhesió [24].

Un cop adherida, la probabilitat que una cèl·lula abandoni una partícula per colonitzar una de nova és altament infreqüent; per això, és molt important assegurar la distribució més uniforme possible de les cèl·lules sobre els microsuports.

L'èxit del cultiu sobre microsuports té dos vessants fonamentals: d'una banda, l'afinitat inherent que tingui la cèl·lula per adherir-se a la superfície de les partícules, i de l'altra l'afavoriment del procés de colonització descrit. Mentre el primer depèn de factors com la pròpia línia cel·lular, les propietats físicoquímiques i estructura del microsuport seleccionat i el medi de cultiu a emprar; el segon es basa en aspectes més operacionals com la implementació a priori d'un protocol d'ancoratge òptim.

Aquest últim ha de tenir com a objectius principals, afavorir el contacte cèl·lula-superfície i millorar la distribució de les cèl·lules sobre les perles. Tanmateix, per aconseguir bons resultats és necessari assegurar el bon estat de l'inòcul. Segons Clark i col., si les cèl·lules utilitzades es troben en la seva fase de creixement exponencial es pot augmentar el rendiment d'adherència entre 2 i 3 vegades [25]. A l'hora de definir el protocol d'ancoratge, l'agitació és el factor més decisiu a considerar. A banda de permetre un entorn homogeni i augmentar la transferència d'oxigen, les forces hidrodinàmiques que se'n deriven poden actuar en detriment de la colonització inicial. Aquesta es pot veure afectada per la col·lisió entre partícules i per la creació de remolins, deguts a variacions aleatòries en la direcció i velocitat del fluid que envolta les partícules [26].

Tenint presents totes les consideracions esmentades i d'acord amb estudis previs publicats al respecte [27, 28], el protocol d'ancoratge aplicat (veure apartat 9.5.1.2 del capítol de materials i mètodes), consisteix a inocular el cultiu en fase exponencial, en un volum inicialment inferior al valor final. Seguidament, sotmetre'l a cicles intermitents d'agitació de 2 minuts cada 30 minuts d'aturada, durant les primeres 12 h, per tal de facilitar el contacte cèl·lula-perla. I, finalment, addicionar el volum restant de medi per mantenir l'agitació continuada.

4.1.1.3.2. Selecció del microsuport

A l'apartat 2.5.1.2 del capítol d'introducció, s'han descrit els diferents tipus de microsuports existents d'acord amb la seva estructura: sòlids, microporosos i macroporosos, i els principals

productors que actualment els comercialitzen.

En base al seu grau d'utilització en processos biotecnològics de cultiu cel·lular, es decideix avaluar el comportament de la línia cel·lular HEK293 sobre tres alternatives: Cytodex1, Cytodex3 i Cytopore2 (GE Healthcare). A continuació, es mostra la seva representació esquemàtica a la Figura 4.4 i es comenten les característiques principals de cadascun d'ells, una descripció més detallada es troba dins de l'apartat 9.5.1.2 del capítol de materials i mètodes.

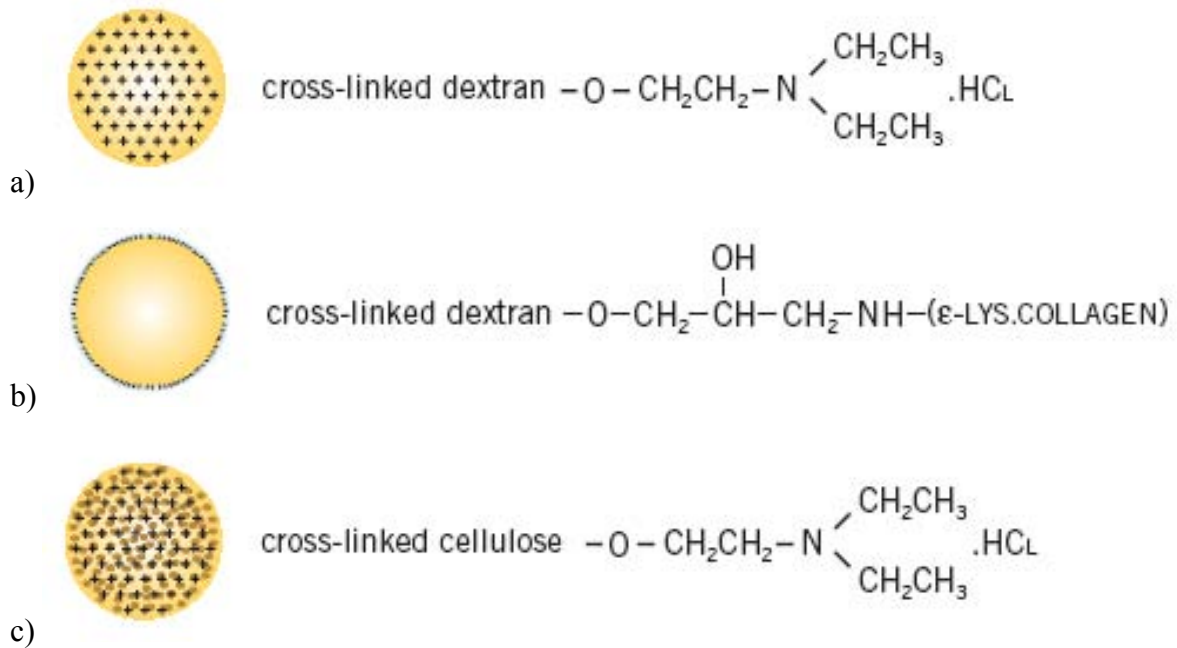


Figura 4.4. Esquema dels diferents microsuports emprats: a) Cytodex1; b) Cytodex3; c) Cytopore2 [27].

- El microsuport microporós Cytodex1 està format per partícules esfèriques amb una mida entre 150 μm i 250 μm , la matriu de les quals és dextrà altament reticulat. Aquesta és tractada per disposar de grups carregats positivament N,N-dietilaminoetil (DEAE) distribuïts uniformement per tota la superfície, els quals afavoreixen l'etapa d'adsorció de la cèl·lula sobre el microsuport [27].
- El microsuport microporós Cytodex3 no disposa de grups sintètics al seu exterior per afavorir l'ancoratge, sinó que aquests són substituïts per una fina capa superficial de col·lagen desnaturalitzat tipus I, covalentment enllaçada amb la matriu esfèrica de dextrà altament reticulat. Aquest recobriment tracta de simular les condicions d'adhesió *in vivo*, a la vegada que facilita la seva digestió mitjançant un ampli espectre de proteases, com la tripsina i la col·lagenasa, per desancorar les cèl·lules sense afectar la integritat i la viabilitat de les mateixes [27].
- Finalment, el microsuport macroporós Cytopore2 està format per intricades partícules esfèriques de cel·lulosa altament reticulada amb un diàmetre entre 200 μm i 280 μm , una elevada porositat, superior al 90%, i una mida mitjana dels porus de 30 μm . Com el Cytodex1, la matriu també es troba recoberta de grups DEAE a la superfície per facilitar

l'adhesió cel·lular [27]. Les dimensions dels porus no només incrementen extraordinàriament la superfície disponible del microsuport, en un intent de facilitar la seva colonització per part del biocatalitzador, sinó que a més aquest pot quedar protegit al seu interior de l'estrès que genera l'agitació del cultiu [29]. Tanmateix, aquests avantatges provoquen un augment de la complexitat per desancorar i recuperar les cèl·lules viables, donat el cas.

L'experiment per seleccionar el *microcarrier* es desenvolupa en flascons agitats de cultiu de 250 mL (Techne), amb un volum de 100 mL de medi DMEM 10% FBS, situats sobre una placa d'agitació a 60 rpm. Aquest muntatge experimental es troba a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 5%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. La concentració d'inòcul és de $1 \cdot 10^5$ cell/mL. Per fer totalment comparables els resultats de creixement cel·lular sobre les diferents opcions, l'àrea de colonització disponible en cadascun dels flascons es manté aproximadament constant en 800 cm². Per tant, donat que cada candidat disposa d'una àrea per unitat de massa característica, les concentracions volumètriques de cadascun esdevenen variables, encara que situades en la mesura del possible, dins dels rangs recomanats pel fabricant [27].

A la Taula 4.2 es mostren les condicions de cultiu relacionades amb els microsuports.

Microsuport	Àrea característica (cm ² /g)	Concentració (g/L)	Volum (mL)	Àrea disponible (cm ²)
Cytodex1	4.400	1,8	100	810
Cytodex3	2.700	3	100	810
Cytopore2	11.000	0,76	100	836

Taula 4.2. Condicions de l'experiment en el sistema de cultiu agitat emprant diferents microsuports.

A diferència del cultiu implementat en el sistema no agitat, i com a conseqüència de la complexitat d'alliberar la totalitat del biocatalitzador del microsuport per realitzar el recompte de cèl·lules viables de les mostres, es decideix aplicar un protocol de recompte més senzill, basat en el mètode d'extrusió nuclear estàndard dissenyat per Sanford i col. [30], i descrit a l'apartat 9.7.1.2 del capítol de materials i mètodes. Les cinètiques de creixement sobre els tres microsuports assajats es mostren a la Figura 4.5.

Segons es pot observar, els perfils de cèl·lules totals al llarg del temps indiquen que els microsuports microporosos, on es dona la colonització superficial de les perles, mostren signes d'un major creixement. En concret, el Cytodex3 aconsegueix la concentració màxima de $23,6 \cdot 10^4$ cell/cm² ($19,1 \cdot 10^5$ cell/mL) a les 140 h de cultiu; seguit pel Cytodex1 amb $13,5 \cdot 10^4$ cell/cm² ($10,9 \cdot 10^5$ cell/mL) a les 116 h; mentre que en el microsuport macroporós Cytopore2, la línia cel·lular no prolifera i es manté en concentracions molt baixes, similars a la de l'inòcul.

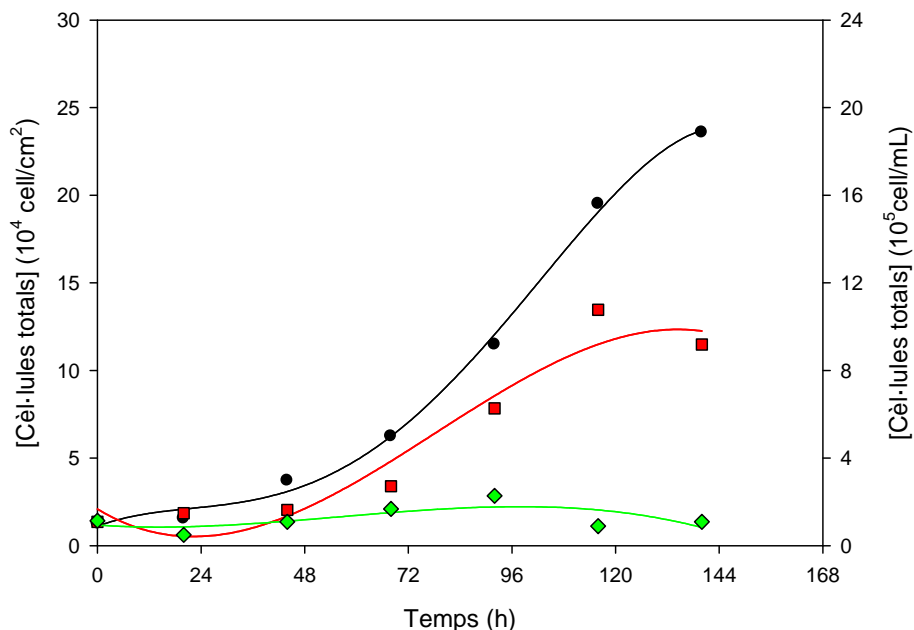


Figura 4.5. Perfils de concentració de cèl·lules totals de la línia adherent HEK293 sobre diferents microsuports en el sistema de cultiu agitat amb la mateixa àrea total de colonització: Cytodex3 (3 g/L, —); Cytodex1 (1,8 g/L, —); Cytopore2 (0,8 g/L, —).

La manca de creixement sobre Cytopore2 pot ser deguda a la seva estructura altament irregular i porosa. D'una banda, les cèl·lules adherides inicialment a la superfície externa poden patir microremolins generats pel trencament del flux al voltant de la perla, donada la seva irregularitat, si no colonitzen els porus amb la suficient rapidesa [26]. Aquestes turbulències poden afectar la viabilitat cel·lular i minimitzar la possibilitat que es colonitzi el microsuport. D'altra banda, aquelles cèl·lules que migren a l'interior dels porus també es podrien veure afectades per la potencial creació de gradients de nutrients i oxigen, els quals poden portar a limitacions en el creixement [31, 32], tot i que aquesta última hipòtesi pot resultar més improbable degut al baix nombre de cèl·lules observat en tot moment a la Figura 4.5.

En comparació amb el comportament descrit al sistema de cultiu no agitat (veure Figura 4.1), en els cultius on es dona una millor proliferació cel·lular (Cytodex3 i Cytodex1), cal deixar palès que mentre que la densitat volumètrica es troba en el mateix rang de valors (aproximadament de $20 \cdot 10^5$ cell/mL), la densitat superficial ostenta valors molt per sota dels anteriorment descrits sense agitació (aproximadament $80 \cdot 10^4$ cell/cm²). Aquest fet demostra que, com era de preveure, els microsuports proporcionen molta més àrea de colonització per unitat de volum respecte el sistema no agitat, però que no tota es troba disponible per a les cèl·lules, donat que aquelles perles no colonitzades un cop finalitzat el protocol d'ancoratge, ja no ho seran al llarg de l'experiment. Per tant, a la Figura 4.5, no es pot parlar d'haver assolit una situació de confluència total al final de l'experiment, fins i tot en el cas del Cytodex3.

En l'actualitat, són relativament escassos els treballs publicats sobre el creixement de cèl·lules HEK293 sobre microsuports amb l'objectiu de poder escalar el procés fins a una etapa productiva de vectors adenovirals. No obstant, els resultats obtinguts concorden amb les conclusions extretes per Keegan i col., on el microsuport microporós Cytodex3 és l'òptim per al creixement de la línia adherent respecte d'altres alternatives macroporoses [33].

Els paràmetres cinètics calculats per al cultiu agitat sobre els diferents microsuports es recullen a la Taula 4.3. Malgrat que, tal i com s'indica a l'Equació 4.1, la determinació de la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$) es basa en el recompte de cèl·lules viables i no de cèl·lules totals, durant la fase de creixement exponencial es pot suposar que l'augment de la densitat cel·lular total advertit, es deu fonamentalment a l'augment en el nombre de cèl·lules viables.

Microsuport	Paràmetres cinètics	
	$\mu_{m\grave{a}x}$ (h^{-1})	t_{dupl} (h)
Cytodex3	0,0259	27
Cytodex1	0,0202	34
Cytopore2	-	-

Taula 4.3. Paràmetres cinètics de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu agitat emprant diferents microsuports.

Els paràmetres calculats corroboren les corbes de creixement mostrades a la Figura 4.5. El microsuport on es dona la proliferació de les cèl·lules més ràpida és el Cytodex3, seguit del Cytodex1; la manca de creixement en el Cytopore2 impossibilita el càlcul dels paràmetres en aquest cas. En comparació amb els paràmetres cinètics obtinguts en el sistema de cultiu no agitat (veure Taula 4.1), els dels microsuports esdevenen menys òptims, donat que l'agitació i els seus efectes secundaris abans citats, com l'estrès que pateixen les cèl·lules adherides degut a fenòmens de col·lisió entre perles en suspensió, afecten la capacitat de proliferació adherent del biocatalitzador.

L'observació sota el microscopi òptic atorga la possibilitat d'avaluar la qualitat del cultiu cel·lular sobre microsuports. En principi, sempre que aquests ho permetin, després de qualsevol presa de mostra fora de línia és essencial contemplar directament l'estat del cultiu sense cap tipus de tinció per determinar si les cèl·lules es troben proliferant majoritàriament adherides a les perles de microsuport o, pel contrari, ho fan en forma d'agregats. Habitualment, un nombre elevat de cèl·lules no adherides és indicatiu que el cultiu s'està deteriorant, degut a l'inici de la fase de mort, la qual cosa es pot relacionar amb diverses raons: baixa idoneïtat del microsuport, fracàs en l'aplicació del protocol d'ancoratge i/o de les condicions de cultiu, baixa capacitat d'adherència del biocatalitzador, etc...

A la Figura 4.6 es mostren imatges microscòpiques dels diferents microsuports, realitzades a les 140 h de cultiu.

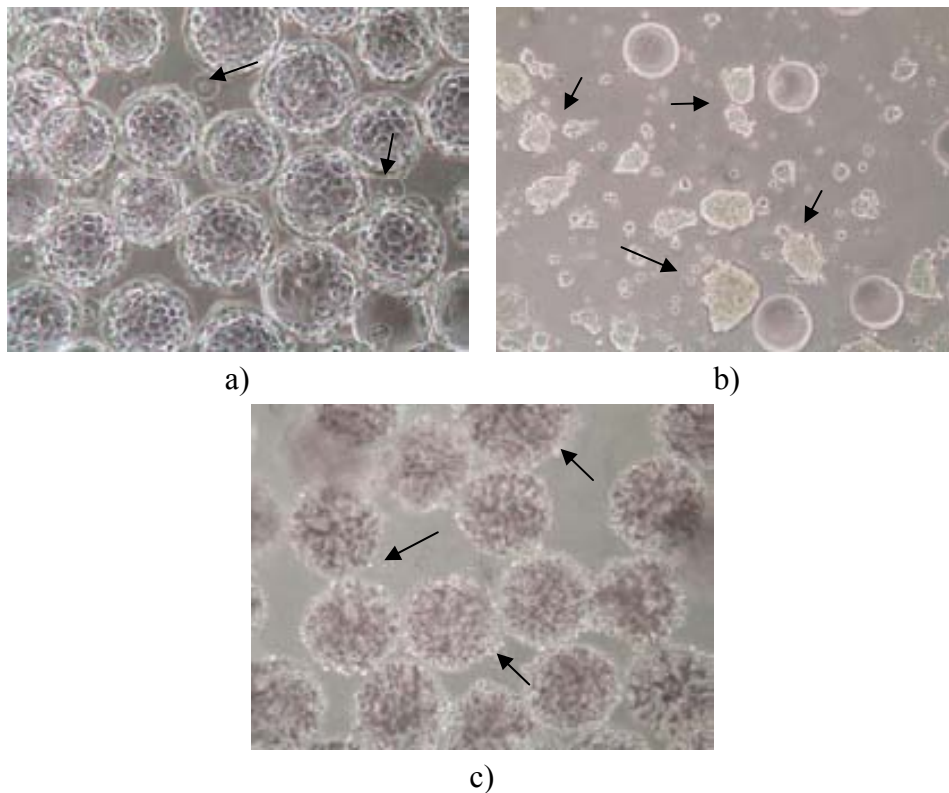


Figura 4.6. Fotografies de microscopi òptic invertit de la línia cel·lular adherent HEK293 sense tinció cultivada sobre diferents microsuports. Les fotografies corresponen a les 140 h de cultiu: a) Microsuport Cytodex3 100X; b) Microsuport Cytodex1 100X; c) Microsuport Cytopore2 100X. Les sagetes indiquen cèl·lules en suspensió i en forma d'agregats.

La Figura 4.6a mostra el bon estat del cultiu sobre el Cytodex3, on s'observen algunes perles individuals colonitzades pel biocatalitzador pràcticament en estat de confluència. En canvi, el cultiu que evoluciona sobre Cytodex1, el qual queda palès a la Figura 4.6b, indica un comportament oposat, amb un baix percentatge de cèl·lules adherides al suport i proliferant en forma d'agregats pluricel·lulars de mida similar a les perles de microsuport, la qual cosa pot justificar el menor creixement apreciat a la Figura 4.5, degut a la formació de zones necròtiques a l'interior d'aquests cúmuls. D'altra banda, aquest fenomen pot provocar un cert error en el recompte nuclear, en perdre's cèl·lules amb el sobrenedant; malgrat tot, el que resulta evident és la menor afinitat de les cèl·lules pel suport. Finalment, els microsuports macroporosos com el Cytopore2 són translúcids, la qual cosa dificulta extremadament l'observació amb el microscopi òptic de cèl·lules adherides, especialment quan es troben a l'interior, tal i com es pot veure a la Figura 4.6c. Aquesta imatge no permet advertir la presència de cèl·lules en suspensió o en forma d'agregats.

Cal destacar que al llarg de tot el procés de colonització dels diferents microsuports, en tots ells s'aprecia biocatalitzador en suspensió. Aquest fet es pot relacionar amb la necessitat de millora en el protocol d'ancoratge, però d'acord amb Nadeau i col., es té coneixement d'una baixa capacitat del tipus cel·lular HEK293 per colonitzar qualsevol microsuport i romandre adherit [34].

Davant la dificultat de realitzar una determinació del nombre de cèl·lules viables en els cultius sobre microsuports, en emprar el mètode directe de recompte per extrusió nuclear, pren encara molta més rellevància el seguiment a través del mètode indirecte basat en la mesura de la concentració de metabòlits com la glucosa i el lactat, si més no, per confirmar les dades de creixement cel·lular anteriorment representades. Els perfils per a cadascun dels microsuports evolucionen segons es mostra a la Figura 4.7.

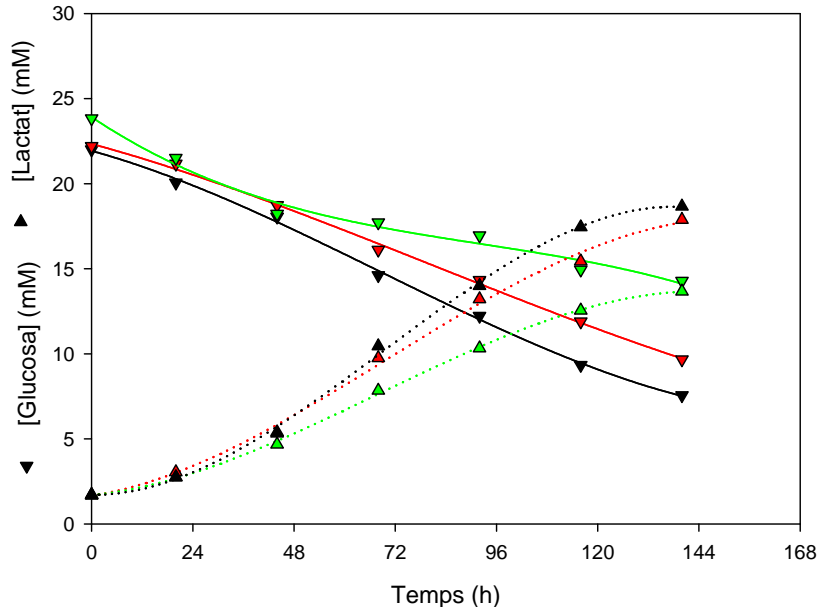


Figura 4.7. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲) de la línia adherent HEK293 sobre diferents microsuports en el sistema de cultiu agitat amb la mateixa àrea total de colonització: Cytodex3 (3 g/L, —); Cytodex1 (1,8 g/L, —); Cytopore2 (0,76 g/L, —).

Les corbes acaben confirmant el comportament dels perfils de concentració de cèl·lules totals exposats a la Figura 4.5, donat que el major consum de glucosa i producció de lactat s'aprecia en el cultiu sobre el microsuport Cytodex3, seguit pel Cytodex1 i pel Cytopore2. Aquest últim ofereix els perfils més suaus de concentració dels metabòlits principals, ja que les variacions es donen només com a conseqüència del manteniment sense proliferació de cèl·lules HEK293 a la seva superfície, o bé en forma d'agregats suspesos.

En finalitzar l'experiment, a les 140 h de cultiu, totes les concentracions de glucosa es troben per sobre de 7 mM, de manera que aquest substrat no esdevé un factor limitant en les corbes de creixement de la Figura 4.5. Pel que fa al lactat, aquest assoleix la concentració més elevada en el cas del Cytodex3 amb un valor de 18,7 mM; com a conseqüència, encara per sota del límit inicial d'inhibició situat, com s'esmenta anteriorment, en 20 mM.

Com en el cas del sistema de cultiu no agitat, determinar si el factor limitant que afecta el creixement de les corbes que configuren la Figura 4.5 es troba en l'exhauriment o l'acumulació d'algun component relacionat amb el medi de cultiu, o bé en la manca de superfície, requereix d'un nou experiment en les mateixes condicions que l'anterior, però amb

un recanvi total de medi. Per simplificar-lo, només es fa servir el microsuport Cytodex3, el qual afavoreix en major mesura la seva colonització. La Figura 4.8 mostra els perfils superposats de concentració cel·lular i de metabòlits.

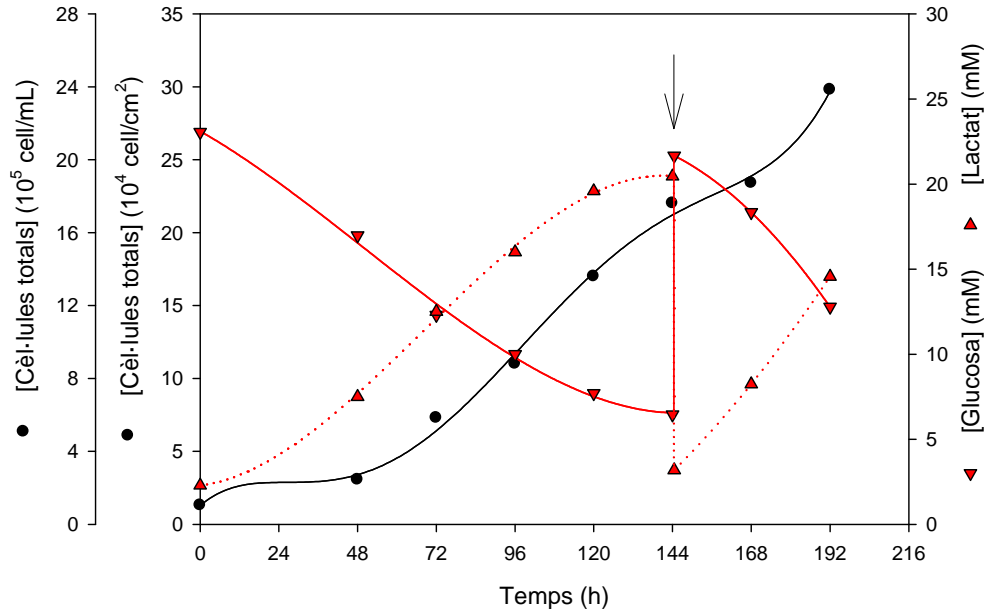


Figura 4.8. Perfil de concentració de cèl·lules totals (●) i dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu agitat amb recanvi de medi utilitzant el microsuport Cytodex3. La sageta indica el moment de l'actuació.

Com es pot observar, durant les 48 h posteriors al recanvi total de medi realitzat a les 144 h de cultiu, la tendència de la corba de creixement canvia i continua ascendint fins assolir un valor final de $29,8 \cdot 10^4$ cell/cm² ($24,1 \cdot 10^5$ cell/mL).

Novament, de manera anàloga a la conclusió extreta en el sistema de cultiu no agitat, el recanvi amb medi fresc permet les cèl·lules continuar el seu creixement i ocupar més àrea. En aquest cas, però, el cultiu no accedeix a una fase de superconfluència, donada la major disponibilitat de superfície respecte el sistema de cultiu no agitat (810 cm² front a 25 cm²). De totes maneres, la limitació observada es continua devent a algun component limitant o inhibitori present al brou de cultiu.

4.1.1.3.3. Concentració d'inòcul

Una vegada seleccionat el microsuport òptim per al cultiu de la HEK293, el següent factor fonamental a optimitzar és la concentració d'inòcul.

L'ancoratge de la cèl·lula a la superfície del microsuport és un esdeveniment probabilístic. Per tant, després de la inoculació, les cèl·lules s'adhereixen als microsuports de forma aleatòria i el nombre de cèl·lules per perla, lluny de distribuir-se homogèniament, ho fan seguint una corba. Com ja s'ha comentat, aquelles partícules de microsuport, sobre les que no s'adhereixen cèl·lules inicialment, romandran desocupades, ja que la probabilitat que una cèl·lula es desancori i colonitzi una nova perla, un cop el cultiu s'iniciï, és mínima. Per tant, la distribució cel·lular després de la inoculació afectarà la màxima concentració cel·lular

assolible en el cultiu i la seva velocitat de creixement, malgrat que les cèl·lules puguin créixer en forma agregats, on aquelles que es trobin a la superfície competiran amb avantatge pels nutrients vers aquelles que es trobin en una localització més interior.

Hu i col. demostren que la distribució aleatòria inicial de les cèl·lules sobre els microsuports un cop es produeix la inoculació pot ésser modelitzada per la distribució de Poisson. Aquesta queda descrita segons l'Equació 4.3, i prediu la freqüència que un microsuport incorpori un cert nombre de cèl·lules per perla, donat un valor mitjà [35].

$$F(B, j) = \frac{\exp(-B) \cdot B^j}{j!}$$

Equació 4.3. Expressió matemàtica de la distribució de Poisson per descriure la distribució inicial de cèl·lules per perla de microsuport, on: $F(B, j)$ és la freqüència de microsuports amb un cert nombre cèl·lules per perla, B és el valor mitjà de cèl·lules per perla, j és el nombre de cèl·lules per perla.

A la Figura 4.9, es mostra la representació tridimensional de l'expressió anterior.

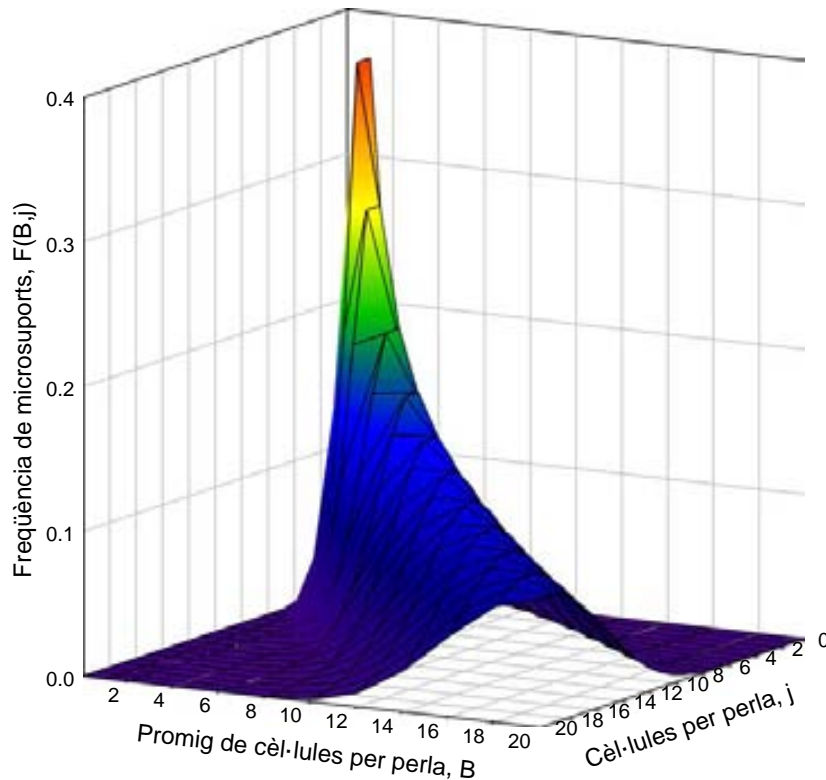


Figura 4.9. Diagrama de distribució de les cèl·lules que colonitzen microsuports seguint la distribució de Poisson (veure Equació 4.3).

Per a un valor mitjà de cèl·lules per perla fixat (B), la corba de freqüència de microsuports presenta una forma gaussiana amb un màxim en el nombre de cèl·lules per perla (j) que coincideix, com és d'esperar, amb l'esmentat valor mitjà. A mesura que aquest valor B augmenta, la freqüència màxima de distribució de microsuports (F) disminueix, de manera que el rang de cèl·lules per perla (j) al llarg del qual es distribueix l'inòcul és més ampli, tal i com es representa a la Figura 4.10.

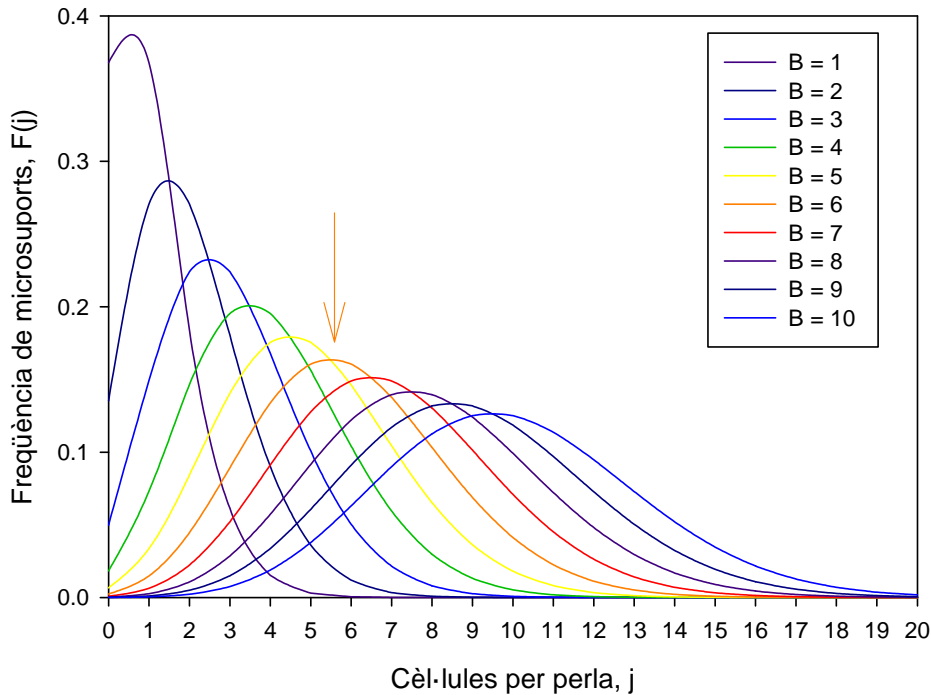


Figura 4.10. Distribució de les cèl·lules que colonitzen microsuports seguint la distribució de Poisson, en funció del valor mitjà (B). La sageta indica el valor crític.

Idealment, a l'inici de qualsevol cultiu, el valor mitjà de cèl·lules per perla hauria d'ésser tal que la freqüència de microsuports amb zero cèl·lules per perla fos mínima. Aquest fenomen es dona a partir d'un valor crític de 6 cell/perla [35]. No obstant, cal advertir que les cèl·lules emprades en el procés d'inoculació no es troben separades individualment moltes vegades, sinó en forma d'agregats que es comporten com a una única unitat d'ancoratge, de manera que s'aconseja inocular, com a mínim, amb una proporció d'entre 8 i 12 cell/perla.

Aquest fet es tradueix, a la pràctica, en una densitat d'inòcul que depèn de les característiques geomètriques del microsuport (nombre de perles per unitat d'àrea), un cop fixada l'àrea del cultiu; per aquesta raó es dona un ventall de concentracions situat entre $0,5 \cdot 10^5$ cell/mL i $2 \cdot 10^5$ cell/mL. Cal esmentar que la concentració d'inòcul es calcula en unitats volumètriques i no d'àrea, ja que les cèl·lules que en formen part es disposen en suspensió temporalment en un volum determinat.

De manera anàloga al creixement en el sistema de cultiu no agitat, una vegada les cèl·lules són adsorbides a la superfície, comença el procés de creixement que porta a la colonització de la totalitat de la partícula en el moment de confluència. Per als tipus cel·lulars subjectes a inhibició per contacte, el creixement s'atura en aquest instant. Malgrat tot, bona part de les línies cel·lulars adherents poden arribar a una situació de superconfluència, és a dir, una vegada no queda més superfície lliure per ésser colonitzada, es continuen formant múltiples capes de cèl·lules proliferant en superposició, tot i que la velocitat de creixement del cultiu es veu reduïda un cop es dona aquest fet.

L'experiment d'optimització de la concentració d'inòcul es realitza en flascons agitats de cultiu de 250 mL, amb un volum de 100 mL de medi DMEM 10% FBS, situats sobre una placa d'agitació a 60 rpm. Aquest muntatge experimental es troba a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 5%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. La concentració de Cytodex3 es fixa en 3 g/L, d'acord amb les indicacions del fabricant, i s'utilitzen dues densitats d'inòcul diferents de $1 \cdot 10^5$ i $2 \cdot 10^5$ cell/mL, les quals es tradueixen en aproximadament 11 cell/perla i 22 cell/perla respectivament, d'acord amb l'àrea superficial per unitat de massa que té el Cytodex3 ($2.700 \text{ cm}^2/\text{g}$). Els resultats es mostren a continuació, a la Figura 4.11.

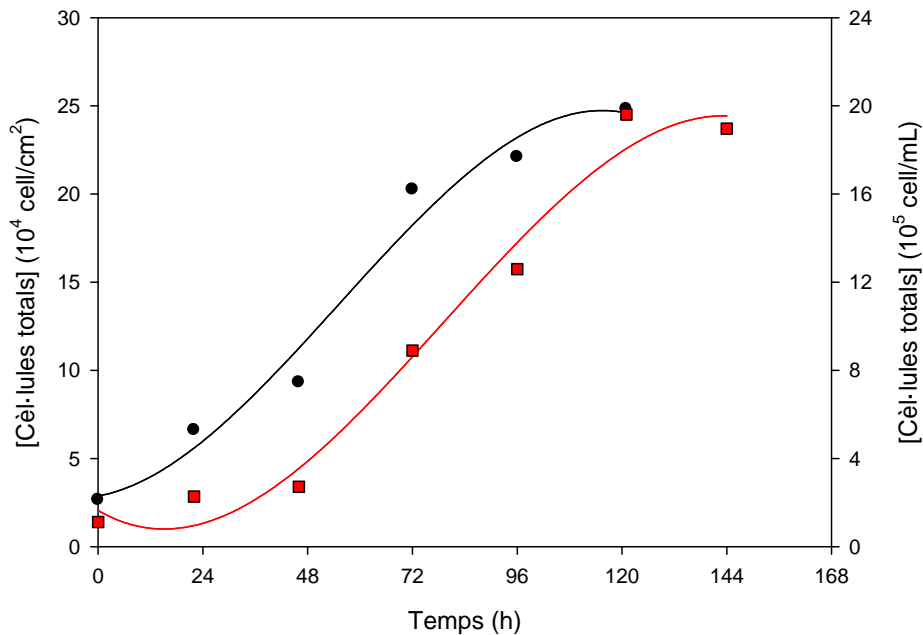


Figura 4.11. Perfils de concentració de cèl·lules totals de la línia adherent HEK293 sobre el microsuport Cytodex3 (3 g/L) en el sistema de cultiu agitat amb diferents concentracions d'inòcul: $2 \cdot 10^5$ cell/mL (●); $1 \cdot 10^5$ cell/mL (■).

El perfil de la corba de proliferació del biocatalitzador sobre el microsuport obtinguda amb un inòcul de $2 \cdot 10^5$ cell/mL evoluciona de forma més ràpida fins a assolir un valor màxim de $24,8 \cdot 10^4$ cell/cm² ($20,1 \cdot 10^5$ cell/mL), concentració de cèl·lules totals on s'inicia la fase estacionària del creixement. Així mateix, la corba resultant a partir de l'inòcul inferior de $1 \cdot 10^5$ cell/mL es caracteritza per presentar al seu inici una fase de latència de 24 h, la qual cosa retarda la seva evolució, tot i progressar després de forma paral·lela a l'anterior fins assolir una concentració màxima de cèl·lules totals de $24,5 \cdot 10^4$ cell/cm² ($19,2 \cdot 10^5$ cell/mL) a les 120 h de cultiu.

Aquest experiment, on s'uneixen la selecció del microsuport i de les condicions òptimes de cultiu, permet efectuar la comparació amb els resultats previs obtinguts amb el sistema no agitat (veure Figura 4.1), independentment de la concentració d'inòcul utilitzada. En aquest sentit, pel que fa als perfils de creixement, ambdós sistemes de cultiu assoleixen una concentració cel·lular volumètrica molt similar (aproximadament de $20 \cdot 10^5$ cell/mL); no

obstant, la concentració superficial dista molt d'èsser comparable, ja que és aproximadament tres vegades menor en el cas del sistema de cultiu agitat.

Els paràmetres cinètics calculats per al sistema agitat emprant les dues concentracions de Cytodex3 es recullen a la Taula 4.4.

Concentració d'inòcul (cell/mL)	Paràmetres cinètics	
	μ_{\max} (h ⁻¹)	t _{dupl} (h)
1·10 ⁵	0,0256	27
2·10 ⁵	0,0267	26

Taula 4.4. Paràmetres cinètics de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu agitat, emprant com a microsuport Cytodex3 (3 g/l) amb diferents concentracions d'inòcul.

Les similituds en els valors confirmen les observacions descrites a la Figura 4.11, amb un comportament cinètic de la cèl·lula quasi idèntic per a ambdues concentracions, únicament diferenciat per la fase de latència observada.

D'acord amb la Taula 4.4, es confirma un lleuger alentiment del creixement en el sistema agitat respecte el no agitat, degut a l'estrès derivat de l'agitació que pateixen les cèl·lules, anteriorment descrit. Tanmateix, les diferències no arriben ni al 15% en cap de les dues concentracions d'inòcul, respecte els paràmetres homòlegs a la Taula 4.1. Aquest fet referma l'adequada selecció del tipus de microsuport i de les seves condicions de cultiu portada a terme, tenint en compte el considerable augment de complexitat operacional que acompanya el cultiu amb microsuports.

Més enllà de l'observació directa de les mostres al microscopi òptic, existeix la possibilitat addicional de tenyir-les per fixar i preservar el seu estat, la qual cosa permet la seva apreciació en repetides ocasions per comparar-ne l'evolució de noves alíquotes; així com la distinció més accentuada de la morfologia cel·lular respecte la superfície del microsuport. En aquest cas, s'utilitza la tinció cristall violeta-etanol, la qual és la més apropiada per als microsuports transparents, com el Cytodex3.

A la Figura 4.12, es mostren diverses imatges preses amb diferents augments del cultiu de cèl·lules HEK293 amb una concentració d'inòcul de 2·10⁵ cell/mL sobre Cytodex3 per apreciar la distribució cel·lular sobre les perles de microsuport.

Tant la Figura 4.12a, com la Figura 4.12b mostren l'estat del cultiu en finalitzar el protocol d'ancoratge, a l'inici de la proliferació cel·lular. A la Figura 4.12a es pot apreciar que una petita fracció de cèl·lules encara es troba en suspensió. Resulta altament improbable que aquestes arribin a colonitzar la superfície d'alguna perla, fins i tot després d'un llarg període de temps; no obstant, poden donar lloc a agregats pluricel·lulars o bé morir. Per altra part, també s'observen partícules de microsuport sense cap cèl·lula adherida, la qual cosa confirma la distribució d'inòcul anteriorment descrita i que el protocol d'ancoratge podria ser més optimitzat encara. Una imatge del mateix instant amb un augment superior es mostra la Figura

4.12b; en aquesta s'aprecia amb nitidesa el canvi de la morfologia cel·lular esferoïdal, pròpia de les cèl·lules en suspensió, vers la seva forma típicament adherent, de tipus fibroblàstic, on el biocatalitzador augmenta l'àrea de contacte amb la perla, abans de començar la seva proliferació.

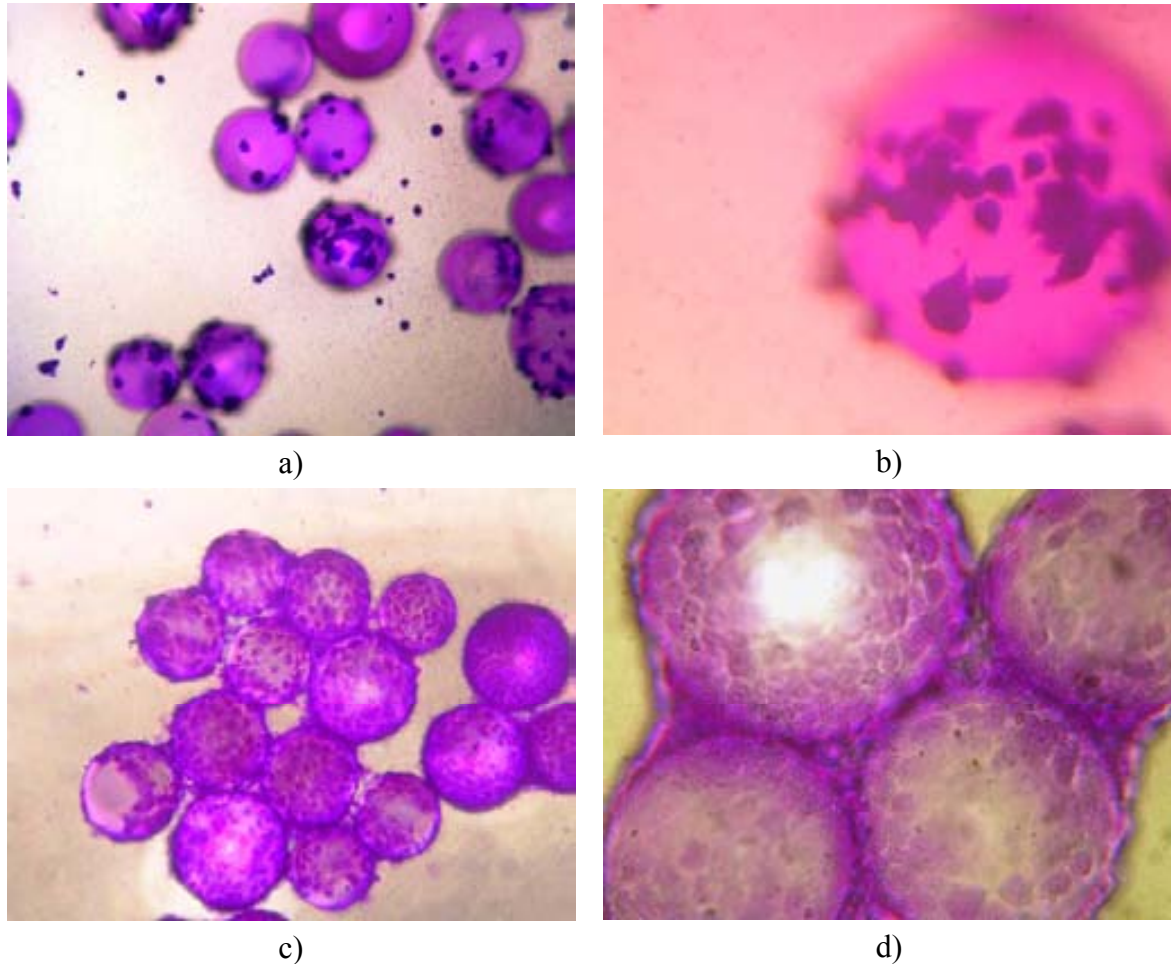


Figura 4.12. Fotografies de microscopi òptic invertit de cèl·lules HEK293 amb un inòcul de $2 \cdot 10^5$ cell/mL proliferant sobre Cytodex3, tenyides amb cristall violeta-etanol. Seguiment del procés de colonització del microsuport. a) Inici del cultiu (Protocol d'ancoratge) 100X; b) Inici del cultiu (Protocol d'ancoratge) 1.000X; c) Final del cultiu 100X; d) Final del cultiu 1.000X. El diàmetre dels microsuports oscil·la entre 140 μm i 210 μm .

D'altra banda, la Figura 4.12c i Figura 4.12d són preses en el moment final del cultiu (120 h). En aquesta primera, es mostren les partícules pràcticament colonitzades en la seva totalitat, encara que s'aprecien zones lliures de cèl·lules, de manera que la concentració cel·lular de la Figura 4.11, podria continuar augmentant sense cap tipus de limitació per àrea.

Com s'ha esmentat anteriorment, en aquells microsuports on s'arriba a confluència, les cèl·lules poden continuar creixent i entrar en superconfluència. Un efecte secundari es mostra a la Figura 4.12d, on les capes superposades de cèl·lules tenen un efecte de pont per unir partícules individuals de microsuport. Si aquest fenomen es dona de forma generalitzada, els cultius comencen a perdre viabilitat. A més, en el context de la producció de vectors adenovirals, és recomanable evitar aquest fenomen, ja que bona part de les cèl·lules del cultiu

romandrien apantallades i el virus no hi tindria accés per iniciar la infecció.

A la Figura 4.13 es mostren els perfils de glucosa i lactat al llarg dels dos cultius amb diferents densitats d'inòcul.

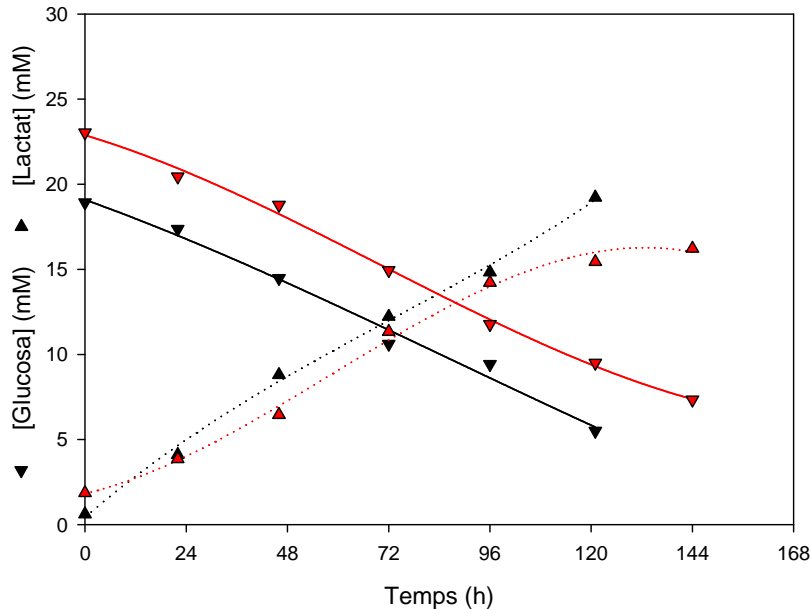


Figura 4.13. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲) de la línia adherent HEK293 sobre el microsuport Cytodex3 (3 g/L) en sistemes de cultiu agitats amb diferents concentracions d'inòcul: $2 \cdot 10^5$ cell/mL(—); $1 \cdot 10^5$ cell/mL (—).

Malgrat la diferència en la concentració de glucosa inicial en els dos experiments, 18,9 mM a l'inòcul de $2 \cdot 10^5$ cell/mL i 23 mM al de $1 \cdot 10^5$ cell/mL, provocada per la dilució inicial del medi en entrar en contacte amb restes de solució isotònica PBS, emprada en les etapes de preparació del microsuport (hidratació i esterilització), els perfils de les corbes evolucionen de forma paral·lela, tant pel que fa al consum de glucosa com a la producció de lactat. Així, en finalitzar l'experiment, la concentració de glucosa i lactat és de 5,5 mM i 19,2 mM respectivament, per a l'inòcul de $2 \cdot 10^5$ cell/mL a les 120 h de cultiu; l'inòcul de $1 \cdot 10^5$ cell/mL presenta valors de glucosa i lactat de 7,3 mM i 16,2 mM respectivament en el moment d'aturada del cultiu, 24 h més tard.

4.1.2. Línia cel·lular no adherent

Com s'ha comentat a la introducció, una alternativa a l'hora de desenvolupar el bioprocés industrial a escala és la de treballar amb cèl·lules en suspensió, d'acord amb la majoria de treballs publicats [34, 36, 37]. D'aquesta forma, el creixement es dona en tot el volum del bioreactor, i s'eviten les problemàtiques ja descrites, associades a disposar de prou superfície per al cultiu.

Tanmateix, partint del fet que bona part de les línies cel·lulars emprades en la producció són adherents, cal que els candidats cel·lulars siguin adaptables al cultiu en suspensió [37]. En aquest sentit, és la mateixa línia cel·lular HEK293 utilitzada fins al moment, la que continua

assumint el protagonisme com a possible productora de vectors adenovirals en suspensió.

4.1.2.1. Medis de cultiu

La majoria de medis comercials dissenyats i optimitzats per a la producció de vectors en suspensió es caracteritzen fonamentalment per eliminar el sèrum de les seves formulacions, donat que, com ja s'ha esmentat, aquest aporta factors que afavoreixen l'adhesió cel·lular.

En general, la utilització de sèrum d'origen animal en la producció de biofàrmacs es troba molt limitada per les agències reguladores. Aquest component no només afecta les característiques de proliferació cel·lular, sinó que també influeix en altres aspectes del bioprocés. Degut a la variabilitat i el desconeixement dels compostos que l'integren, el sèrum pot afectar la reproductibilitat del procés de producció lot a lot. D'altra banda, pot provocar problemes d'operació i de validació del producte, en dificultar i/o interferir amb el procés de purificació, així com perjudicar la qualitat final dels vectors adenovirals. Finalment, la seva eliminació repercuteix directament sobre l'economia global del procés, ja que el sèrum pot significar fins a un 85% del cost del medi de cultiu, quan l'escala de producció augmenta [3].

Els medis lliures de sèrum introdueixen una sèrie de components substitutius del mateix, a vegades no analitzats en la seva totalitat, entre els quals es troben hidrolitzats d'origen animal o vegetal i, fins i tot, barreges hormonals, com per exemple l'anomenada HITES, la qual es troba composta per hidrocortisona, insulina, transferrina, etanolamina i seleni. Menció a part requereixen els medis lliures de sèrum que, a més, són químicament definits. Aquests es diferencien perquè tots i cadascun dels components que formen part de la seva formulació es troben identificats i amb concentracions perfectament conegudes.

Cada línia cel·lular posseeix uns requeriments nutricionals propis per al seu creixement. Per tant, extrapolar la utilització d'un medi lliure de sèrum desenvolupat per a una línia cel·lular concreta en una altra, pot no provocar els mateixos efectes. Per aquesta raó, el que es fa normalment és provar medis comercials específicament destinats al cultiu de la cèl·lula HEK293. De l'ampli ventall existent, se'n seleccionen dos per portar a terme els següents experiments: el CD293 i el 293 SFMII.

Ambdós es troben especialment dissenyats i optimitzats per adaptar la cèl·lula al creixement en suspensió, mantenir-la en cultius d'alta densitat i facilitar la producció de vectors adenovirals. Són medis produïts i comercialitzats per Invitrogen Corporation, de composició protegida, i amb les següents característiques generals:

- El CD293 és un medi químicament definit, el qual es troba formulat sense proteïnes o pèptids d'origen animal, vegetal o sintètic. A més, la seva formulació es troba exempta de lisats o hidrolitzats d'origen desconegut.
- El 293 SFMII és un medi comercial, la formulació del qual no conté components d'origen humà o animal. La baixa concentració en proteïnes (<10 mg/L) facilita el posterior procés de purificació.

4.1.2.2. Sistema de cultiu agitat: procés d'adaptació a suspensió

Tot i que existeix la possibilitat de cultivar línies cel·lulars no adherents en sistemes de cultiu no agitats, aquest fet només obeeix la necessitat de subcultivar, just després de la seva descongelació i previ al seu escalat en sistemes de cultiu agitat. És en aquests últims on veritablement s'aprofita el potencial de la proliferació en suspensió, ja que proporcionen les condicions d'homogeneïtat de nutrients i oxigen, les quals permeten assolir densitats elevades evitant la manipulació requerida pel cultiu adherent. A més, aquesta idea és reforçada pel procés d'adaptació que ha de transformar un tipus adherent en un no adherent i que, excepte casos molt concrets, on s'aconsella inicialment començar amb flascons no agitats, sempre es du a terme en sistemes agitats per allunyar el creixement de la línia cel·lular del seu entorn original no agitat el més ràpidament possible.

El procés d'adaptació consta de diversos protocols on es donen un seguit d'actuacions sobre el cultiu consistents en recanvis totals o parcials de medi, segons evolucioni el creixement del cultiu. L'objectiu principal és realitzar una selecció clonal a nivell de fenotip de la subpoblació cel·lular capaç de proliferar millor en les noves condicions.

Normalment, qualsevol protocol s'inicia amb una elevada densitat d'inòcul, al voltant de $5 \cdot 10^5$ cell/mL, en previsió d'un alentiment en la velocitat específica de creixement màxima, de fenòmens d'agregació i d'una davallada en la viabilitat cel·lular abans d'assolir una adaptació total. El procés exigeix un esforç considerable per part de la cèl·lula, no acostumada a proliferar en les noves condicions de cultiu, on, sense anar més lluny, es perden tots els avantatges que aporta el sèrum al medi de cultiu.

Existeixen dues alternatives bàsiques per a l'adaptació d'una línia cel·lular adherent al seu creixement en suspensió, les quals són escollides en funció del medi emprat i de les recomanacions que fa el fabricant: l'adaptació directa i l'adaptació seqüencial.

- En l'adaptació directa, les cèl·lules són extretes del medi original, centrifugades i, sense cap pas previ, inoculades en el nou medi lliure de sèrum i dissenyat específicament per al creixement en suspensió.
- En canvi, l'adaptació seqüencial es porta a terme mitjançant una sèrie d'etapes on es van substituint successivament i de forma progressiva les concentracions del medi i sèrum originals pel nou. Malgrat que, per definició, requereix d'un període de temps més elevat per assolir l'objectiu final, aquesta estratègia es planteja per portar a terme l'adaptació de la manera més segura i menys traumàtica possible per al biocatalitzador.

De totes maneres, és important destacar que també és possible adquirir la cèl·lula prèviament adaptada seguint algun dels dos protocols anteriors per evitar l'aplicació del protocol d'adaptació.

Així, a la Figura 4.14, es compara el comportament de la línia cel·lular adherent HEK293, abans d'iniciar l'adaptació, és a dir, després dels primers subcultius en els medis CD293 i 293

SFMII, amb la línia cel·lular ja adaptada en medi 293 SFMII, la qual es denomina HEK293S per diferenciar-la de l'anterior. L'experiment es desenvolupa en flascons agitats de cultiu de 250 mL, amb un volum de 100 mL de medi, situats sobre una placa d'agitació a 60 rpm. Aquest muntatge experimental es troba a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 8%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. La concentració d'inòcul és de $3 \cdot 10^5$ cell/mL en tots els cultius.

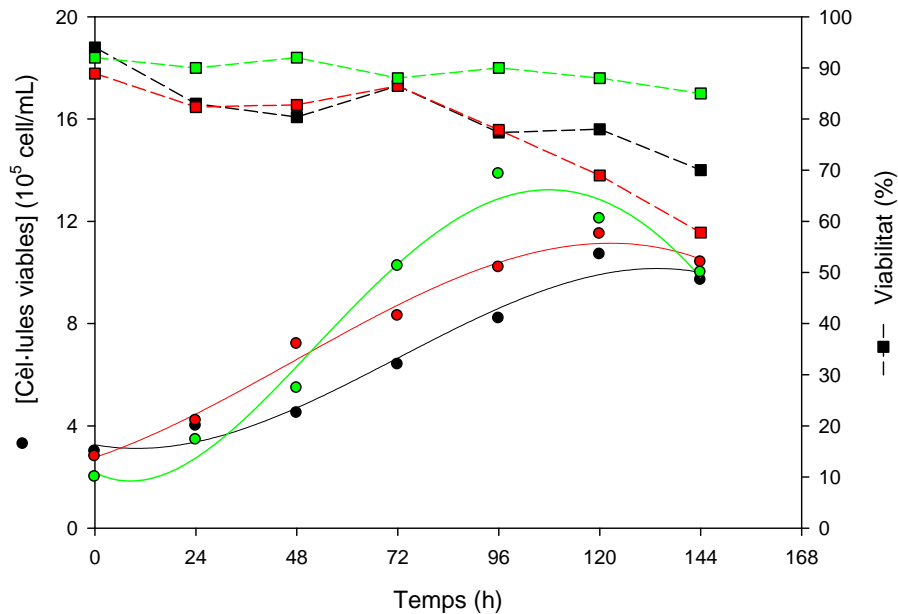


Figura 4.14. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●) i de viabilitat cel·lular (■) de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu agitat. Efecte del procés d'adaptació a suspensió: HEK293 en medi 293 SFMII (—); HEK293 en medi CD 293 (—); HEK293S (adaptada) en medi 293 SFMII (—).

Les dades experimentals posen de manifest, com era d'esperar, les diferències significatives de comportament entre els dos tipus de la línia cel·lular, abans i després de sotmetre-la al procés d'adaptació a suspensió. En primer lloc, destaca l'evolució del perfil associat a la línia cel·lular HEK293S, amb una concentració cel·lular màxima de $14 \cdot 10^5$ cell/mL, assolida a les 96 h de cultiu. La viabilitat cel·lular inicialment té un valor d'un 92% per davallar lleugerament al llarg de l'experiment fins a un 85% a les 144 h.

Pel que fa al creixement del biocatalitzador no adaptat, a nivell macroscòpic es fa evident la presència de cúmuls pluricel·lulars, els quals dificulten el seguiment de la concentració cel·lular, tot i que es tracta de desfer-los en el moment del recompte. D'altra banda, els perfils continuen exhibint un comportament característic, però allunyat del de la cèl·lula HEK293S. En ambdós casos, la densitat cel·lular màxima és assolida a les 120 h de cultiu (24 h més tard que el cultiu adaptat), els valors són de $11,5 \cdot 10^5$ cell/mL i $10,7 \cdot 10^5$ cell/mL, per a la cèl·lula HEK293 proliferant en medi CD293 i 293 SFMII respectivament. A la vegada, les viabilitats cel·lulars dels dos cultius pateixen descensos acusats i continuats respecte el seu valor inicial, tot i l'estabilització existent d'aquesta tendència a les 72 h de cultiu; així, en el medi CD293, la viabilitat cau més d'un 30%, des del 89% fins al 58% final, i en el medi 293 SFMII, els

valors davallen del 94% fins al 70%. Aquest descens és característic en les primeres fases dels processos d'adaptació i es va corregint a mesura que s'actua sobre els cultius amb nous recanvis de medi.

Com a conclusió, la millora i estabilització de la viabilitat de cel·lular, l'augment de la densitat cel·lular i de la pendent de la corba de creixement, directament relacionada amb la velocitat específica màxima, esdevenen els principals criteris per determinar la finalització amb èxit del protocol d'adaptació.

A la Taula 4.5 es recullen els paràmetres cinètics, on queden reflectides les diferències entre les cèl·lules adaptades i les que no ho estan.

Línia cel·lular	Medi d'adaptació	Paràmetres cinètics	
		$\mu_{\text{màx}}$ (h ⁻¹)	t_{dupl} (h)
HEK293	293 SFMII	0,0106	65
HEK293	CD 293	0,0117	59
HEK293S	293 SFMII	0,0207	33

Taula 4.5. Paràmetres cinètics de les diferents línies cel·lulars amb creixement no adherent avaluades.

Les baixes velocitats específiques de creixement de la cèl·lula HEK293 en els medis d'adaptació confirmen el seu incipient cultiu en suspensió i la manca d'aclimatació a les noves condicions; en contrast amb els valors que presenta el tipus cel·lular HEK293S adaptat en medi 293 SFMII. En concret, la $\mu_{\text{màx}}$ resulta un 85% superior al valor mitjà de la línia no adaptada, això es tradueix en un temps de duplicació un 46% inferior. El valor d'aquest paràmetre després de l'adaptació torna a ésser molt proper a l'interval ressenyat per a línies cel·lulars productores (24 – 30 h) [5], tot i ser lleugerament superior.

En comparació amb la línia cel·lular adherent HEK293 cultivada en el mateix sistema de cultiu agitat sobre microsuports, s'observen una sèrie de diferències que cal comentar. En primer lloc, els paràmetres cinètics de la Taula 4.4, calculats per a la concentració d'inòcul òptima de $2 \cdot 10^5$ cell/mL ($\mu_{\text{màx}} = 0,0267$ h⁻¹ i $t_{\text{dupl}} = 26$ h), són millors; malgrat tot, cal recordar que només resulten valors calculats a partir de la concentració cel·lular total. En segon lloc, i com a conseqüència de la cinètica de creixement més ràpida, s'assoleixen majors densitats cel·lulars en el mateix període de temps, fins arribar a una concentració màxima de $20,1 \cdot 10^5$ cell/mL ($24,8 \cdot 10^4$ cell/cm²) (veure Figura 4.11).

Tanmateix, pel que fa a aspectes purament operacionals del cultiu, l'eliminació dels microsuports en el cultiu no adherent facilita enormement la manipulació i operació del procés de producció, per exemple eliminant les fases d'ancoratge i desancoratge del biocatalitzador sobre el suport.

Finalment, la mesura indirecta de metabòlits com la glucosa i el lactat, pot no resultar tan cabdal com en el cas del cultiu adherent, ja que la manipulació de les mostres ara resulta

ostensiblement més senzilla. Malgrat tot, continua aportant valuosa informació sobre l'estat metabòlic del cultiu i sobre possibles fenòmens de limitació o d'inhibició del creixement en relació amb la concentració d'aquests components al llarg del temps. Els perfils d'ambdós metabòlits es mostren a la Figura 4.15.

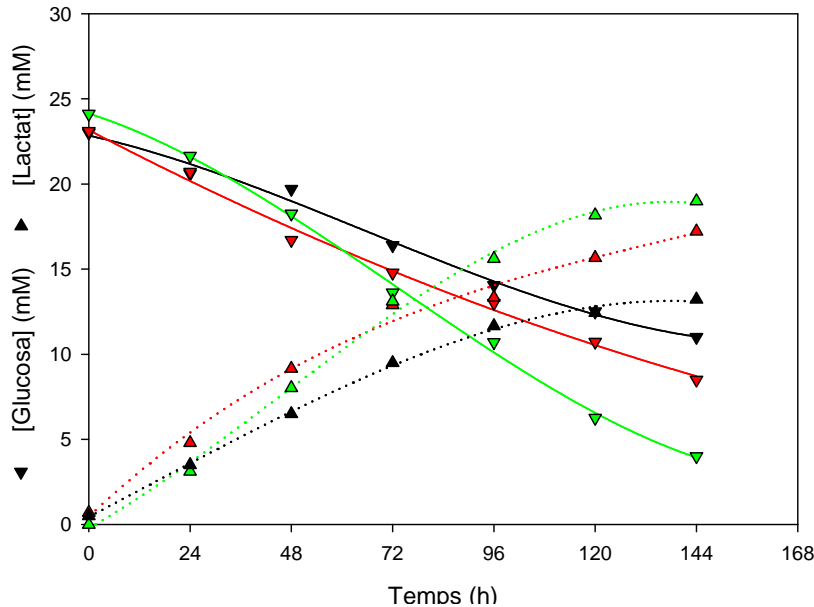


Figura 4.15. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), de la línia adherent HEK293 en el sistema de cultiu agitad. Efecte del procés d'adaptació a suspensió: HEK293 en medi 293 SFMII (—); HEK293 en medi CD 293 (—); HEK293S adaptada en medi 293 SFMII (—).

De manera anàloga a les conclusions que s'extreuen de la Figura 4.1 i la Figura 4.7, l'anterior representació mostra una variació dels rangs de concentració de glucosa i lactat entre valors que no indiquen cap limitació ni inhibició respectivament per a cap cultiu. De manera que, la corba que exhibeix els perfils amb diferències més acusades, relacionada amb la cèl·lula HEK293S, ofereix un valor de glucosa de 19 mM i de lactat de 4 mM en finalitzar l'experiment a les 144 h de cultiu.

Per tant, si fos necessari, caldrien més anàlisis suplementàries no només per conèixer les raons que donen explicació a les corbes de creixement de la Figura 4.14, sinó per conèixer en profunditat la formulació dels medis comercials utilitzats. Si més no, les dades inicials proporcionen una lleugera informació de la composició del medi CD293 i el 293 SFMII, els quals no mostren indicis de lactat i una concentració aproximada de glucosa de 25 mM (4,5 g/L), el mateix valor que presenta el medi DMEM emprat en la línia cel·lular adherent.

Davant el coneixement adquirit sobre els diferents tipus cel·lulars a l'abast que poden esdevenir productors de la partícula adenoviral, fóra possible iniciar un procés de discussió per seleccionar el biocatalitzador òptim, a partir de criteris relacionats només amb el grau de complexitat operacional del cultiu, o basats en les dades cinètiques determinades. No obstant, a banda dels aspectes de creixement estudiats fins ara, la selecció correcta de la línia cel·lular durant el desenvolupament del procés també ha de tenir en compte la seva interacció amb el

vector, és a dir, l'estudi del cicle infectiu i dels principals paràmetres relacionats amb aquest, doncs, en definitiva es tracta del producte final.

4.2. Caracterització del procés d'infecció adenoviral

Els trets característics de l'adenovirus s'han descrit al capítol d'introducció, tant a nivell d'estructura i cicle infectiu, així com el disseny i les modificacions genètiques que ha sofert per obtenir el vector adenoviral de primera generació que s'utilitza. No obstant, amb l'objectiu d'agilitzar el desenvolupament del bioprocés per tal de millorar la productivitat vírica, es requereix la quantificació ràpida, precisa i reproduïble dels vectors adenovirals produïts. Per tant, la selecció del model de vector a emprar esdevé una qüestió primordial.

En aquest context, la proteïna verda fluorescent (GFP), provinent de la medusa *Aequorea victoria*, es pot emprar com a marcador visual mitjançant l'expressió del gen corresponent [38-40], incorporat al genoma adenoviral (veure Figura 4.16a), d'acord amb l'apartat 9.1 del capítol de materials i mètodes. La proteïna GFP és un polipèptid constituït per 238 aminoàcids que pateix una ciclació intramolecular, la qual cosa dóna lloc al fenomen de fluorescència molecular. A diferència d'altres marcadors, com per exemple el gen que codifica per a la β -galactosidasa, la GFP no requereix cap substrat addicional per ésser detectable, de manera que permet mesurar l'expressió a temps real, mitjançant mètodes no invasius com la microscòpia de fluorescència o la citometria de flux [41, 42].

Tal i com es mostra a la Figura 4.16b, per emetre fluorescència de color verd per sobre de 510 nm, la GFP només necessita l'excitació de llum blava en el rang de 470-490 nm.

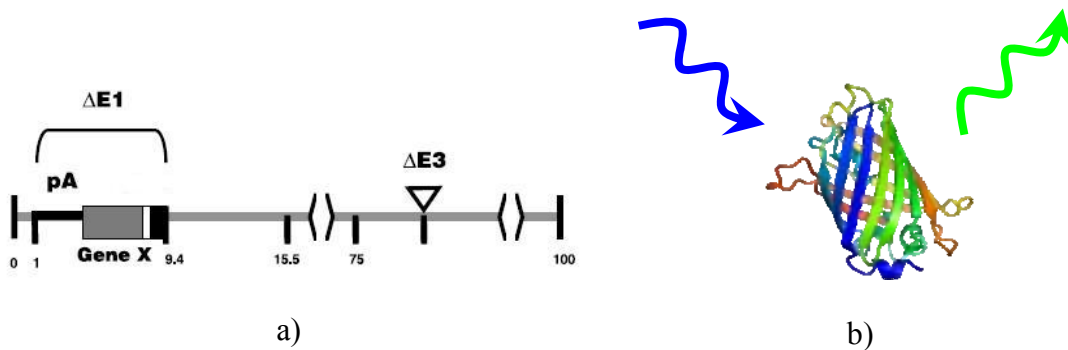


Figura 4.16. a) Genoma del vector adenoviral de primera generació: situació del gen marcador de la proteïna GFP (*Gene X*) [34]; b) Estructura de la proteïna GFP.

A banda de les característiques inherents al viriò, existeixen una sèrie de paràmetres clau que caracteritzen qualsevol procés d'infecció, l'optimització dels quals afectarà el seu rendiment global. Aquests consisteixen en la Multiplicitat d'Infecció (MOI) i un conjunt relacionat amb les actuacions temporals anomenat Temps d'Actuació (TOAs). Dins dels TOAs es donen tres tipus d'accions principals: el Temps d'Alimentació (TOF), el Temps d'Infecció (TOI) i el Temps de Recollida de producte (TOH) [2].

A mode descriptiu, a la Figura 4.17 es mostra un esquema per situar els diferents temps d'actuació al llarg de l'evolució hipotètica d'un cultiu. Es mostren dues possibilitats d'actuació segons l'estratègia de producció, la qual es discuteix al següent capítol del treball. La primera es basa en infectar un cultiu no alimentat en el TOI_1 i recollir-lo en el moment TOH_1 . En canvi, la segona es basa en iniciar un cultiu alimentat just al final de la fase de creixement, en el moment TOF , de manera que sigui possible infectar a major concentració cel·lular en el TOI_2 i recollir el producte posteriorment en TOH_2 , a priori amb un augment del rendiment.

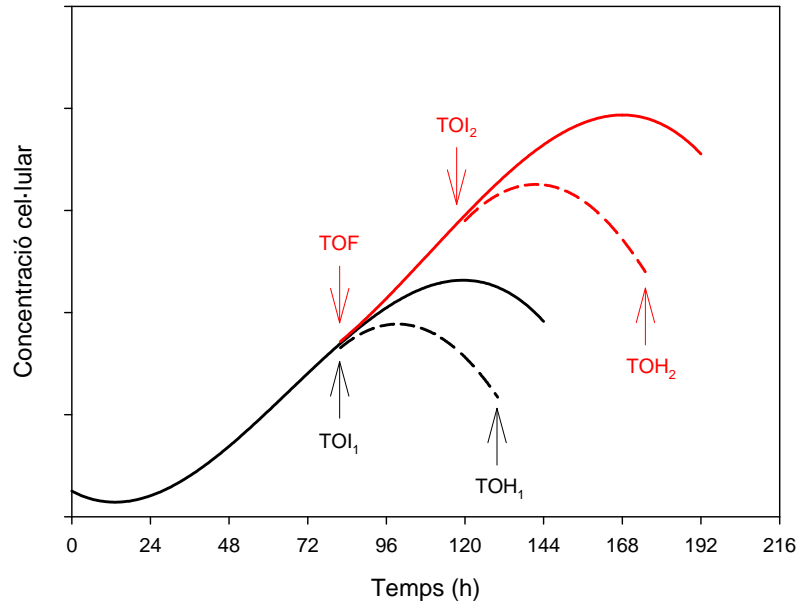


Figura 4.17. Situació dels diferents TOAs d'acord amb l'evolució d'un cultiu no alimentat (—) i alimentat (—) (Figura adaptada de [2]).

Tot seguit, en els següents apartats es realitza una descripció més detallada dels paràmetres propis del cicle infectiu.

4.2.1. Temps d'infecció (concentració d'infecció)

El temps d'infecció (TOI) és un paràmetre fonamental que influeix directament en el rendiment de la producció vírica. La necessitat per part del virus de replicar-se aprofitant l'energia disponible de la cèl·lula obliga a trobar una instant, preferiblement pròxim al final de la fase exponencial del creixement, on existeixi un elevat nombre de cèl·lules disponibles per ésser infectades en el millor estat metabòlic i fisiològic possible, i, a més, que pugui assegurar, en la mesura del possible, que cap tipus de limitació o inhibició afectarà el biocatalitzador al llarg del cicle infectiu.

Segons es pot apreciar a la Figura 4.17, la determinació del temps d'infecció implica automàticament la determinació de la concentració d'infecció. De fet, en la major part dels estudis publicats sobre la producció de vectors adenovirals es troba molt més estesa la referència a aquesta última expressada en unitats de volum [5, 34, 36, 37], probablement per convenció, o bé degut al fet que el temps d'infecció proporciona menys informació sobre les

condicions del cultiu a l'inici de la infecció.

La determinació del temps o la concentració d'infecció es basa en el coneixement a priori de la línia cel·lular productora i del seu creixement sense infecció. La cèl·lula resulta, doncs, un factor primordial del qual depèn el TOI. Malgrat tot, no és l'únic: el medi de cultiu i, sobretot, l'estratègia de producció també són igualment importants. Aquelles estratègies que impliquen la possibilitat d'addicionar medi fresc al cultiu poden modificar ostensiblement el comportament de la corba de creixement, tal i com s'observa a la Figura 4.17. A mode de guia, emprant l'estratègia de producció en discontinu (no alimentada), la qual s'adopta per la seva senzillesa en tots els experiments que integren aquest capítol, i una línia cel·lular productora no adherent, diversos autors consideren que l'interval de concentracions d'infecció òptim se situa entre $5 \cdot 10^5$ cell/mL i $10 \cdot 10^5$ cell/mL [5].

D'acord amb el comportament de la línia cel·lular adherent HEK293, ja analitzat (veure Figura 4.11), la concentració d'infecció màxima podria estendre's fins a una densitat de $20 \cdot 10^5$ cell/mL; en canvi, l'anàlisi de la corba de creixement de la cèl·lula HEK293S (veure Figura 4.14) confirma el rang bibliogràfic citat. Amb l'objectiu de poder comparar ambdós tipus cel·lulars, es decideix fixar una concentració d'infecció de $8 \cdot 10^5$ cell/mL, com a valor de compromís en els posteriors experiments.

4.2.2. Temps d'alimentació

Com s'ha dit, el temps d'alimentació (TOF) indica el moment de transició entre un cultiu en discontinu i l'inici de l'addició de medi fresc, de forma contínua o semicontínua, per tal d'assolir concentracions cel·lulars més altes i infectar posteriorment. Per tant, resulta clar que el TOF no és un paràmetre exclusiu dels processos infectius, sinó que pertany a qualsevol procés, on s'alimenti el cultiu cel·lular.

De moment no es fixa cap valor de TOF, donat que encara no es vol desenvolupar cultius alimentats per tal d'obtenir resultats de forma més ràpida i simple.

4.2.3. Temps de recollida

El temps de recollida (TOH) es defineix com aquell temps d'actuació postinfecció en el qual s'atura el cicle infectiu, i es col·lecta el contingut final del procés de producció per iniciar la purificació dels vectors adenovirals. Amb l'objectiu de maximitzar el rendiment d'aquesta etapa, el temps de recollida ha de coincidir amb la màxima producció vírica [43].

La importància d'aquest paràmetre és cabdal, ja que afecta directament la reproductibilitat del procés de producció, així com les dimensions dels equips que s'utilitzaran en les etapes posteriors de purificació. Donat el comportament lític del virus, els vectors adenovirals produïts romanen distribuïts inevitablement entre el sobrenedant i l'interior de les cèl·lules infectades; per tant, un augment o disminució en el TOH fa que la major part del producte es trobi extra o intracel·lularment, i sigui necessari purificar un volum de cultiu més o menys considerable.

Com en el cas dels paràmetres anteriors, existeixen diversos factors que intervenen a l'hora de definir el TOH òptim: la línia cel·lular productora, l'estabilitat del transgen que incorpora el vector adenoviral, l'estratègia de producció i, fins i tot, altres paràmetres del cicle infectiu com la multiplicitat d'infecció. Tanmateix, el rang de valors més publicat a la literatura se situa entre els 2 i 3 dies postinfecció [5, 34, 37]. Existeixen, però, diversos autors que retarden el temps de recollida, fins a 7 dies postinfecció o fins que la lisi cel·lular del cultiu sigui completa [44, 45]. No obstant, en aquests casos es poden observar pèrdues d'infectivitat degut a possibles fenòmens d'agregació entre virions [37].

Finalment, després de tenir en compte aquestes consideracions i amb l'objectiu de no perllongar excessivament el procés de producció, es decideix fixar el temps de recollida en 48 h postinfecció en tots els experiments realitzats d'ara en endavant.

4.2.4. Multiplicitat d'infecció

La primera etapa d'adsorció del cicle infectiu i els mecanismes previs de transport difusionals que acaben per posar en contacte el virió amb la superfície de la cèl·lula depenen essencialment de la multiplicitat d'infecció (MOI), la qual es defineix com el nombre de partícules víriques aportades al sistema per cèl·lula viable cultivada.

La MOI es veu afectada pel tipus de vector, el seu disseny [5], i l'estabilitat d'aquest, no només durant el temps d'infecció pròpiament dit, sinó també considerant els processos previs de congelació, descongelació i manipulació. Típicament, els valors de MOI emprats en la bibliografia oscil·len entre 10 i 200 unitats infectives per cada cèl·lula (UI/cell). Tot i això, existeixen diversos autors, com Schoofs i col., que publiquen diferències no significatives en infectar cultius de $10 \cdot 10^5$ cell/mL amb MOIs que varien entre 1 UI/cell i 125 UI/cell, després d'un TOH de 48 h postinfecció [46].

La determinació del valor òptim de la MOI assegura una infecció adequada amb un nombre de virions que permet una reproductibilitat de la cinètica del procés, tot maximitzant el rendiment de producció. Com es descriu a la introducció, donat que les infeccions per adenovirus són relativament ràpides, els processos de producció de vectors adenovirals es dissenyen amb MOIs superiors a 1 UI/cell per assegurar que la pràctica totalitat de les cèl·lules siguin infectades poc després de la inoculació. Tanmateix, la infecció amb més partícules que les òptimament requerides, lluny de millorar el rendiment del procés, únicament incrementa els costos de l'inòcul víric.

Per tal d'avaluar l'efecte de la MOI sobre les dues línies cel·lulars productores estudiades fins al moment, s'estudia l'efecte de dos valors diferents de 5 UI/cell i 10 UI/cell. La resta de paràmetres del cicle infectiu romanen constants: concentració d'infecció de $8 \cdot 10^5$ cell/mL i TOH de 48 h postinfecció.

Les corbes d'infecció es confeccionen mitjançant el seguiment de la concentració de partícules totals (intracel·lulars i extracel·lulars) en unitats infectives (UI/mL), tot utilitzant el protocol de detecció de la proteïna fluorescent GFP per citometria de flux desenvolupat per

Côté i col. [41] (veure apartat 9.7.2.1 del capítol de materials i mètodes). La quantitat de virus produïts en un cultiu, en principi, sempre és directament proporcional a la quantitat de proteïna GFP detectada.

4.2.4.1. Infecció de la línia cel·lular adherent

4.2.4.1.1. Sistema de cultiu no agitat

Els experiments d'infecció es desenvolupen en flascons de cultiu de 25 cm², amb un volum de 10 mL de medi DMEM 10% FBS. Aquests se situen a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 5%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. Per evitar limitacions degudes al medi de cultiu, la infecció s'inicia substituint la totalitat del volum de medi exhaurit durant la fase de creixement per medi fresc que conté l'inòcul víric.

Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4.18, amb la representació de les dues corbes d'infecció obtingudes en eixos semilogarítmics.

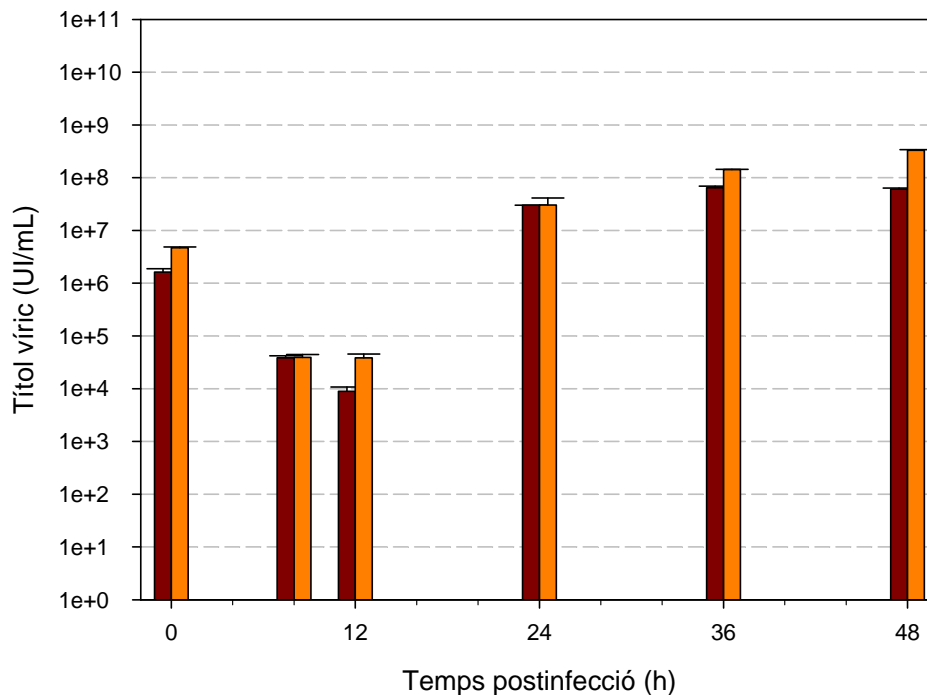


Figura 4.18. Corba d'infecció, efecte de la multiplicitat d'infecció (MOI) en cultius emprant la línia adherent HEK293 en el sistema no agitat. Seguiment de les partícules infectives totals: MOI=5 UI/mL (■); MOI=10 UI/mL (■).

En general, s'aprecia una evolució del títol víric molt similar per a ambdues MOIs, caracteritzada per la davallada que pateix l'inòcul víric, amb valors inicials de $2,6 \cdot 10^6$ UI/mL i $6,7 \cdot 10^6$ UI/mL, assolint un mínim a les 12 h postinfecció de $1 \cdot 10^4$ UI/mL i $3,9 \cdot 10^4$ UI/mL, per a la MOI de 5 i 10 UI/cell respectivament. A partir d'aquest moment, el títol víric augmenta de forma progressiva fins als valors màxims recollits de $6,1 \cdot 10^7$ i $3,3 \cdot 10^8$ UI/mL en arribar al TOH.

La interpretació d'aquesta corba s'ha de cercar en les etapes que componen el cicle infectiu de l'adenovirus. Amb l'accés del virió al citoplasma, durant l'etapa de penetració, el virió perd l'estructura de la càpsida, tot just abans que el seu genoma accedeixi al nucli cel·lular i comenci la seva replicació. Aquest fet és el que provoca la pseudodesaparició de les partícules fins a les 12 h postinfecció, on queda l'excés de virions que no han infectat cèl·lules. Les següents etapes del cicle comporten la formació de nous vectors que fan augmentar el títol víric fins a bastar el temps de recollida.

Per determinar quina és la MOI òptima d'inoculació, a banda de l'ús obvi de la concentració vírica final produïda a l'experiment, un element addicional que pot aportar més informació és el ràtio d'amplificació (RA), és a dir, el nombre de vegades que s'incrementa l'inòcul víric inicial en el temps de recollida, la qual cosa indica el seu grau d'aprofitament. Considerant els esmentats títols inicials i finals de les infeccions, s'obtenen uns valors de RA de 23,5 i 43,9 per a la MOI de 5 UI/cell i 10 UI/cell respectivament.

Com a conclusió, doncs, la MOI òptima per al sistema de cultiu no agitat és de 10 UI/cell, donat que proporciona un títol final superior, i un RA de pràcticament el doble respecte el calculat amb la MOI de 5 UI/cell. Aquesta última suposa un valor subòptim, ja que les partícules víriques en excés observades a les 12 h postinfecció podrien haver infectat més cèl·lules, encara que la manca d'agitació ho evita.

L'avanç del procés infectiu també es pot confirmar de forma directa, mitjançant l'observació microscòpica contínua que aprofita la fluorescència emesa per la proteïna GFP. Així, a la Figura 4.19 s'aprecia la seqüència corresponent a una MOI de 5 UI/cell, on queda palès l'augment significatiu del nivell de fluorescència. Tot i això, a la Figura 4.19c, encara es troben buits sense fluorescència ocupats per cèl·lules que encara no han estat infectades en el temps de recollida.

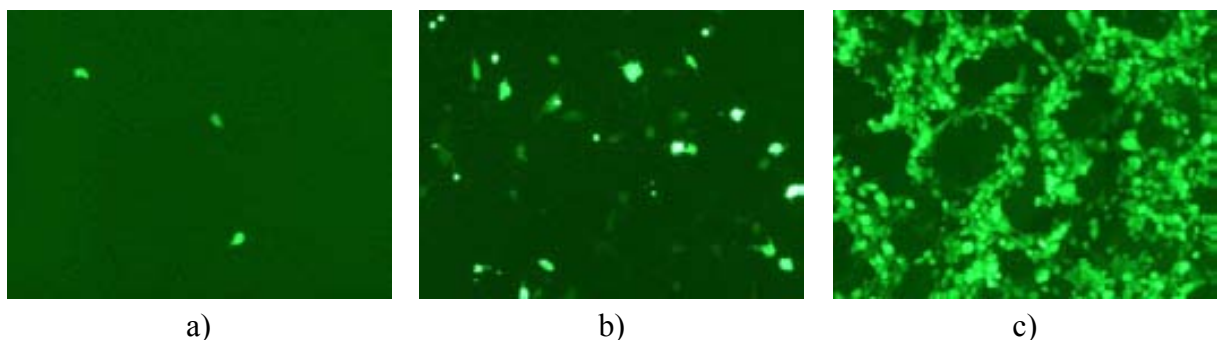


Figura 4.19. Fotografies amb microscopi òptic de fluorescència de la línia adherent HEK293 infectada en el sistema de cultiu no agitat. Seguiment del procés d'infecció a través de la detecció de la proteïna fluorescent GFP que incorpora el genoma adenoviral. a) 2 h postinfecció 100X; b) 12 h postinfecció 100X; c) 48 h postinfecció 100X.

4.2.4.1.2. Sistema de cultiu agitat sobre microsupsports

L'experiment d'infecció es desenvolupa en flascons de cultiu de 250 mL amb una agitació de 60 rpm, un volum de 100 mL de medi DMEM 10% FBS i una concentració de microsupsports

Cytodex3 de 3 g/L, segons les conclusions extretes de l'apartat 4.1.1.3.3. Aquest muntatge experimental es troba a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 5%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. En aquest cas, la infecció també s'inicia substituint el volum de medi exhaurit per medi fresc amb l'inòcul víric, gràcies a la facilitat per sedimentar que proporciona el microsuport colonitzat. Els resultats d'infecció es mostren tot seguit, a la Figura 4.20.

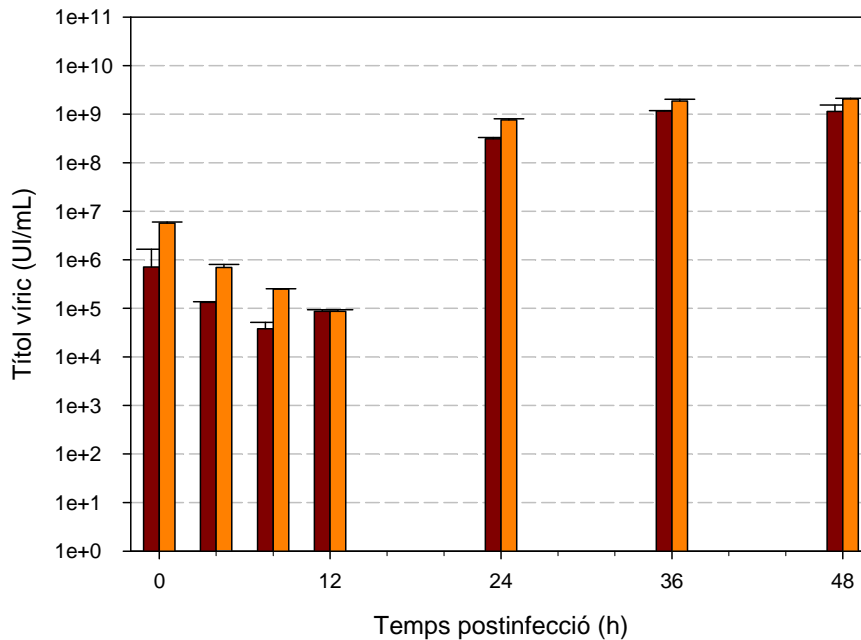


Figura 4.20. Corba d'infecció, efecte de la multiplicitat d'infecció (MOI) en cultius emprant la línia adherent HEK293 sobre el microsuport Cytodex3 (3 g/L) en el sistema agitat. Seguiment de les partícules infectives totals: MOI=5 UI/mL (■); MOI=10 UI/mL (■).

Les corbes no es diferencien significativament en comparació amb les de la Figura 4.18. Tanmateix, l'aspecte més destacable de la Figura 4.20 és l'augment dels títols vírics d'ambdues representacions a partir de les 24 h postinfecció, la qual cosa porta a uns valors màxims de $1,1 \cdot 10^9$ i $2,0 \cdot 10^9$ UI/mL a les 48 h postinfecció, per a la MOI de 5 i 10 UI/cell respectivament.

Atenent els títols inicials dels inòculs de $2,0 \cdot 10^6$ UI/mL i $7,0 \cdot 10^6$ UI/mL, els ràtios d'amplificació també canvien ostensiblement amb valors de 550,0 i 285,7 per a la MOI de 5 UI/cell i de 10 UI/cell respectivament. Per tant, donat que l'agitació facilita el contacte entre virus i cèl·lula, també augmenta el grau d'aprofitament que es fa de l'inòcul víric, sobretot en cas que la MOI sigui igual a 5 UI/cell. Malgrat tot, amb l'objectiu principal de mantenir el màxim rendiment de producció, la MOI òptima segueix essent de 10 UI/cell, ja que procedent d'aquesta s'aconsegueix pràcticament el doble de títol víric a les 48 h postinfecció.

Els microsuports, a diferència del sistema de cultiu no agitat, confereixen la possibilitat de realitzar un seguiment visual del cicle infectiu sobre el microsuport senzillament gràcies a l'observació de les imatges per microscòpia, com les mostrades a la Figura 4.21.

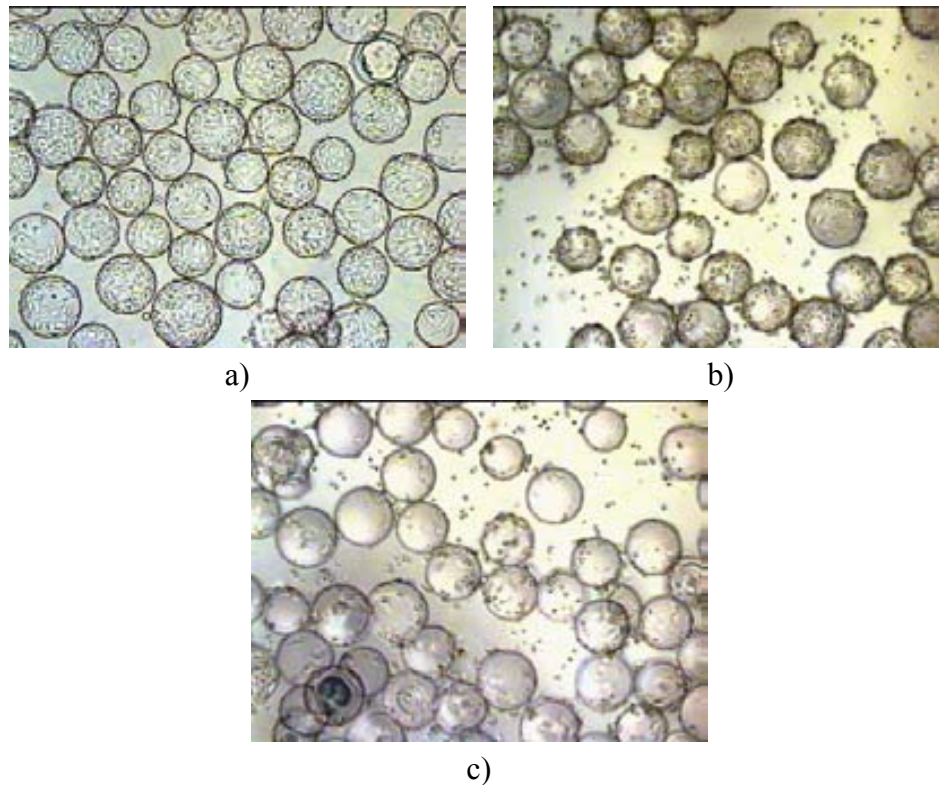


Figura 4.21. Fotografies de microscopi òptic invertit de la línia adherent HEK293 infectada sobre el microsuport Cytodex3 (3 g/L) en sistema de cultiu agitat. Seguiment del procés d'infecció: a) 0h postinfecció 50X; b) 24h postinfecció 50X; c) 48h postinfecció 50X.

L'efecte més característic de l'avanç de la infecció sobre el cultiu es reflexa en el procés de desanclatge que pateixen les cèl·lules, cada vegada més acusat a mesura que avança el procés d'infecció. Aquest fenomen, el qual no s'adverteix en el sistema de cultiu anterior per la manca d'agitació, es relaciona amb la pèrdua de viabilitat que pateix el cultiu i la baixa capacitat de la línia cel·lular HEK293 per romandre firmament adherida sobre el microsuport [34]. No obstant, el desanclatge natural del biocatalitzador facilita la recollida de les cèl·lules i la posterior purificació del producte, sense necessitat d'implementar complexos protocols de recollida que usin solucions proteolítiques a base d'enzims com la tripsina o la col·lagenasa, les quals poden encarir el procés global.

4.2.4.1.3. Comparació d'infectivitat: sistema de cultiu

La selecció de la MOI òptima per a la producció de vectors en cadascun dels diferents sistemes on es cultiva la cèl·lula productora adherent, permet comparar-los, tot seguit, en la Figura 4.22.

La forma de les corbes d'infecció permet observar la influència del sistema de cultiu com a factor clau en la producció emprant la línia cel·lular adherent. Malgrat la utilització d'inòculs vírics molt similars en el cas agitat ($7,0 \cdot 10^6$ UI/mL) i no agitat ($6,7 \cdot 10^6$ UI/mL), el títol final obtingut en el primer a les 48 h postinfecció és aproximadament un ordre de magnitud superior ($2,0 \cdot 10^9$ UI/mL). La principal raó es deu molt probablement a l'augment de les probabilitats d'encontre i contacte entre el vector adenoviral i la cèl·lula adherida al microsuport en suspensió, gràcies a l'agitació. El sistema de cultiu no agitat es troba limitat

per la capacitat de difondre del virus en la capa de cèl·lules, la qual no és molt important [47].

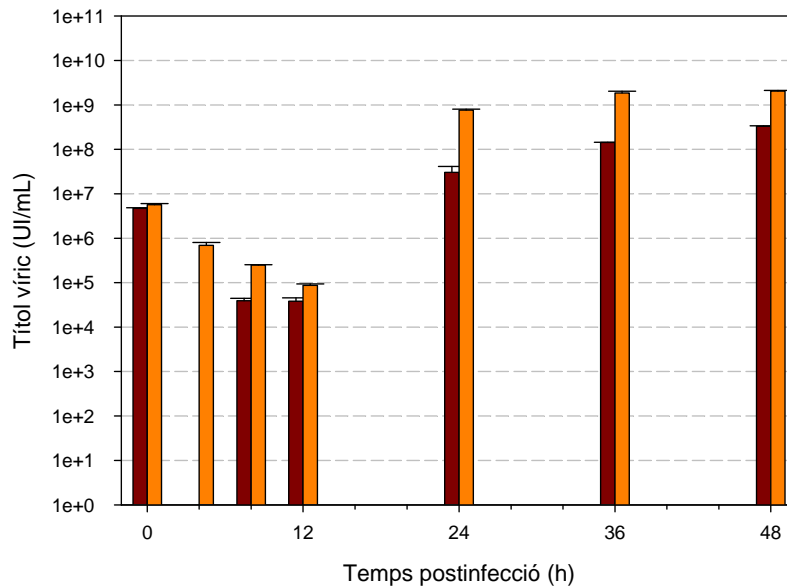


Figura 4.22. Corba d'infecció, efecte del sistema de cultiu emprant la línia adherent HEK293 i una multiplicitat d'infecció (MOI) òptima de 10 UI/cell. Seguiment de les partícules infectives totals: No agitad (■); Agitat (■).

Per tant, tot i l'exigència operativa addicional que implica l'ús de microsuports en el sistema agitad, no hi ha dubte sobre l'avantatge per a la producció de vectors del sistema agitad respecte el no agitad.

Cal afegir que aquesta conclusió no concorda amb el treball publicat per Wu i col., on es posa de manifest que, utilitzant la mateixa línia cel·lular adherent, el sistema de cultiu no agitad és més eficient que l'agitad amb microsuports. Com a possible causa, es planteja la possibilitat que les forces hidrodinàmiques, derivades de l'agitació, tinguin un efecte negatiu sobre els receptors de la membrana cel·lular, responsables de les fases preliminars del cicle infectiu [20]. Tanmateix, resulta interessant destacar que la concentració d'infecció superficial (cell/cm^2) no és manté constant en els seus experiments, essent més elevada en els microsuports. Per tant, en aquests últims podria donar-se un fenomen de superconfluència que fes disminuir el títol víric, tot conduint a una conclusió errònia.

D'acord amb les condicions experimentals amb les que es desenvolupen els anteriors cultius, la concentració d'infecció superficial tampoc no és la mateixa. D'aquesta forma, en el sistema de cultiu no agitad es dona la infecció a $32 \cdot 10^4 \text{ cell}/\text{cm}^2$ i en l'agitad a $10 \cdot 10^4 \text{ cell}/\text{cm}^2$. Aquest fet podria validar la hipòtesi proposada per Wu i col., ja que una situació de superconfluència en el sistema de cultiu no agitad pot haver limitat el títol víric. No obstant, tenint en compte les corbes de creixement en ambdós sistemes (veure Figura 4.1 i Figura 4.11), les concentracions d'infecció emprades sempre es troben en la fase de creixement exponencial, lluny dels impediments que implica la superconfluència en la velocitat específica màxima i la infectivitat.

4.2.4.2. Infecció de la línia cel·lular no adherent

L'experiment es desenvolupa amb la cèl·lula HEK293S en flascons agitats de cultiu de 250 mL, amb un volum de 100 mL de medi 293 SFMII, situats sobre una placa d'agitació a 60 rpm. Aquest muntatge experimental es troba a l'interior d'un incubador, on es manté una atmosfera de CO₂ del 8%, temperatura de 37 °C i humitat del 95%. Per evitar limitacions degudes al medi de cultiu exhaurit, la infecció s'inicia substituint-lo, després de centrifugar les cèl·lules a 500 G durant 5 minuts.

A continuació, es presenten els resultats d'infecció de la línia cel·lular no adherent, recollits a la Figura 4.23.

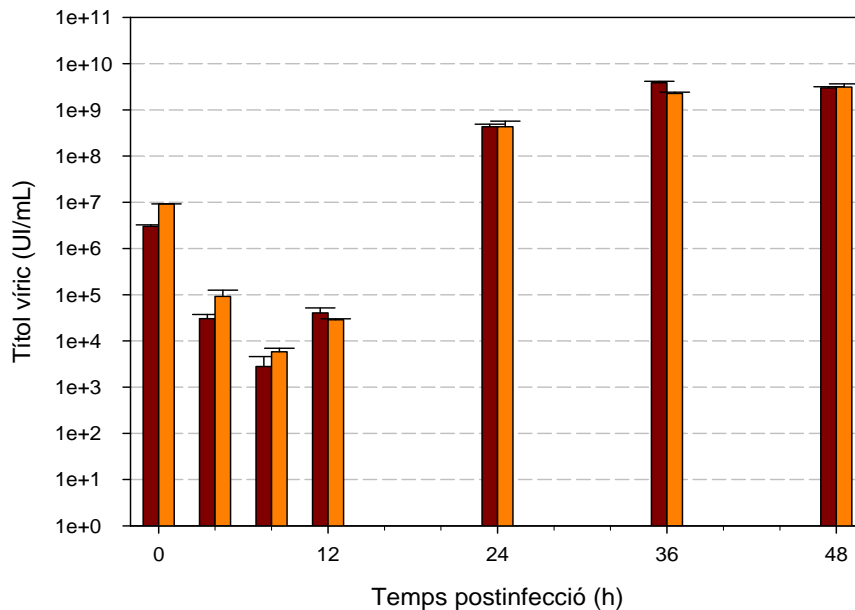


Figura 4.23. Corba d'infecció, efecte de la multiplicitat d'infecció (MOI) en cultius emprant la línia no adherent HEK293S. Seguiment de les partícules infectives totals: MOI=5 UI/mL (■); MOI=10 UI/mL (■).

Les corbes d'infecció confirmen una millor accessibilitat dels vectors adenovirals a la cèl·lula no adherent HEK293S, adaptada al creixement en suspensió. Així, les concentracions víriques evolucionen des de valors inicials de $3,0 \cdot 10^6$ UI/mL i $6,2 \cdot 10^6$ UI/mL, passant pels valors mínims a les 8 h postinfecció (4 h menys respecte la línia productora adherent), fins abastar títols molt similars entre sí en el moment de recollida de $3,0 \cdot 10^9$ i $3,1 \cdot 10^9$ UI/mL, per a la MOI de 5 i 10 UI/cell respectivament.

Considerant aquesta reduïda diferència en els valors finals, juntament amb els RA que se'n deriven de les dades (1.000,0 per a MOI de 5 UI/cell i 500,0 per a MOI de 10 UI/cell), es pot afirmar que, en aquest cas, la multiplicitat d'infecció òptima per tractar els cultius en suspensió és de 5 UI/cell. D'altra banda, aquesta conclusió implica que la MOI també es veu afectada per la línia cel·lular, i no només pel vector adenoviral i la seva estabilitat.

4.2.5. Comparació d'infectivitat: línia cel·lular productora

Una vegada avaluades les alternatives per a la producció de vectors adenovirals que ofereixen tant la línia cel·lular adherent HEK293 com la no adherent HEK293S, es pot realitzar una anàlisi comparativa en quant als resultats globals d'infectivitat.

Ambdues alternatives basades en el sistema de cultiu agitat, les quals es mostren a la Figura 4.24 i d'on s'extreu un major rendiment del procés, refermen l'agitació com a factor clau per millorar el procés d'infecció i tornen a rebatre les conclusions de Wu i col., referides anteriorment i fonamentades en l'aparició de possibles efectes negatius provinents de forces hidrodinàmiques [20], les quals també s'haurien de fer-se evidents en el cultiu no adherent.

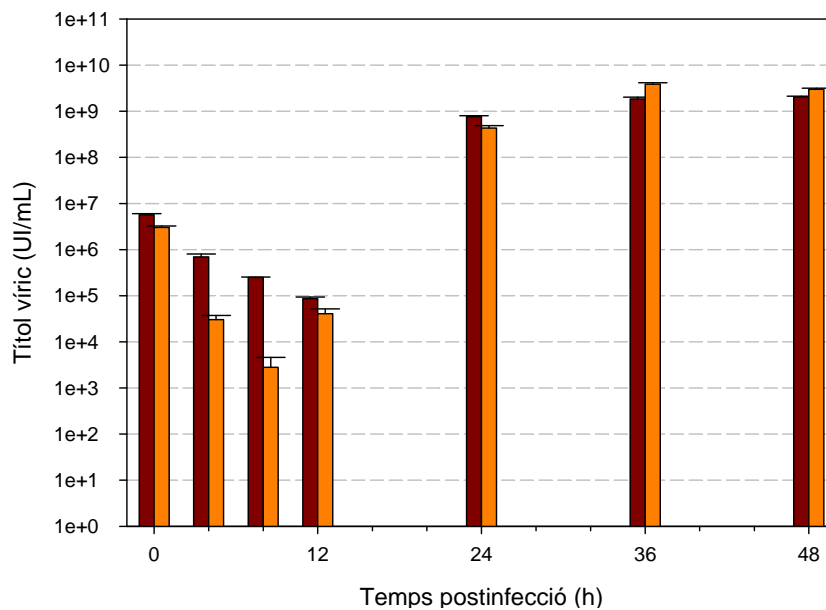


Figura 4.24. Corba d'infecció, comparació de les línies cel·lulars en el sistema de cultiu agitat amb la multiplicitat d'infecció (MOI) òptima. Seguiment de les partícules infectives totals: HEK293, MOI=10 (■); HEK293S, MOI=5 (■).

Malgrat la utilització d'una multiplicitat d'infecció superior en el cas de la línia cel·lular adherent, a les 48 h postinfecció, el títol víric obtingut en el cas de la línia cel·lular HEK293S és de $3,0 \cdot 10^9$ UI/mL, un 50% superior al que presenta la línia cel·lular adherent HEK293 de $2,0 \cdot 10^9$ UI/mL.

A banda de la productivitat, existeixen també altres aspectes que es veuen igualment afavorits en la infecció de la cèl·lula no adherent. Aquest és el cas de la davallada inicial de la corba i la situació del títol víric mínim, el qual es relaciona directament amb el temps de penetració de l'adenovirus al citoplasma, d'acord amb el raonament basat en les etapes del cicle infectiu. A la figura anterior, la davallada més significativa en el títol víric la pateix la cèl·lula HEK293S al llarg de les primeres 4 h postinfecció, encara que el seu mínim absolut s'assoleix posteriorment, a les 8 h postinfecció, 4 h abans que la línia cel·lular adherent. De manera que la cèl·lula adaptada minimitza el temps de penetració i, també redueix l'excés de partícules infectives "desaprofitades" restants en el sobrenedant. En general, la tendència descrita es

compleix igualment a totes les corbes d'infecció analitzades, per la qual cosa cal esmentar que el temps de penetració es considerarà un factor decisiu en etapes posteriors del desenvolupament del procés, tal i com es discutirà en el següent capítol.

D'altra banda, l'estabilització pràcticament generalitzada de la concentració vírica en totes les corbes d'infecció analitzades, a partir de les 36 h postinfecció, referma la bona elecció del temps de recollida. El títol víric només augmenta lleugerament quan s'assoleixen les 48 h postinfecció.

Com a conclusió, en base als avantatges que ofereix el seu cultiu, però principalment pel major rendiment global del cicle infectiu i la major productivitat vírica obtinguda, s'escull la línia cel·lular no adherent HEK293S per continuar el desenvolupament del procés d'obtenció de vectors adenovirals. De manera que, no serà necessari abordar posteriors optimitzacions del cultiu amb la línia cel·lular adherent amb la intenció d'ajustar-ne les condicions de cultiu a la normativa GMP, per exemple, amb la possible eliminació del sèrum existent en el medi i l'ús de medi alternatius específicament dissenyats per a cultiu en adherència.

Una vegada adquirits els coneixements sobre la línia cel·lular productora i la seva interacció amb el vector adenoviral, i seleccionada quina és l'alternativa òptima i les seves condicions de cultiu i infecció, es planteja l'estudi de la següent etapa del treball. Aquesta es basa en el desenvolupament de la producció en bioreactor, la qual implica un nou estudi a nivell enginyeril focalitzat en l'augment d'escala per satisfer les necessitats de producte.

4.3. Bibliografia

1. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. 1977. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology 36(1): 59-72.
2. Lecina, M. 2007. *Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
3. Ozturk, S.S. and Hu, W.S. 2005. *Cell Culture Technology For Pharmaceutical And Cell-based Therapies*: Taylor & Francis Group p.
4. Shacter, E. 1989. *Serum-free media for bulk culture of hybridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies*. Trends in Biotechnology 7(9): 248-253.
5. Altaras, N.E., Aunins, J.G., Evans, R.K., Kamen, A., Konz, J.O. and Wolf, J.J. 2005. *Production and formulation of adenovirus vectors*. Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260.
6. Eibl, R., Eibl, D., Portner, R., Catapano, G. and Czermak, P. 2009. *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 1st ed. Heidelberg: Springer Verlag. 363 p.
7. Masters, J.R.W. 2000. *Animal Cell Culture a Practical Approach*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press. 315 p.
8. Nadeau, I., Garnier, A., Côté, J., Massie, B., Chavarie, C. and Kamen, A. 1996. *Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies*. Biotechnology and bioengineering 51(6): 613-623.
9. Van Wezel, A.L. 1967. *Growth of cell strain and primary cells on microcarriers in homogeneous culture*. Nature 216: 64-65.
10. Mendonca, R.Z., Ioshimoto, L.M., Mendonca, R.M., De-Franco, M., Valentini, E.J., Becak, W., Raw, I. and Pereira, C. 1993. *Preparation of human rabies vaccine in Vero cell culture using a microcarrier system*. Braz. j. med. biol. res 26(12): 1305-1317.
11. Kistner, O., Barrett, P.N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S. and Dorner, F. 1998. *Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine*. Vaccine 16(9-10): 960-968.
12. Berry, J.M., Barnabe, N., Coombs, K.M. and Butler, M. 1999. *Production of reovirus type-1 and type-3 from Vero cells grown on solid and macroporous microcarriers*. Biotechnology and bioengineering 62(1): 12-19.
13. Moran, E. 1999. *A microcarrier-based cell culture process for the production of a bovine respiratory syncytial virus vaccine*. Cytotechnology 29(2): 135-149.
14. Takagi, M., Okumura, H., Okada, T., Kobayashi, N., Kiyota, T. and Ueda, K. 1994. *An oxygen supply strategy for the large-scale production of tissue plasminogen activator by microcarrier cell culture*. Journal of fermentation and bioengineering 77(3): 301-306.

15. Goldman, M.H., James, D.C., Rendall, M., Ison, A.P., Hoare, M. and Bull, A.T. 1998. *Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells*. *Biotechnology and bioengineering* 60(5): 596-607.
16. Jo, E.C., Yun, J.W., Jung, K.H., Chung, S.I. and Kim, J.H. 1998. *Performance study of perfusion cultures for the production of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in a 2.5 l spin-filter bioreactor*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 19(5): 363-372.
17. Iyer, P., Ostrove, J.M. and Vacante, D. 1999. *Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production*. *Cytotechnology* 30(1): 169-172.
18. McTaggart, S. and Al-Rubeai, M. 2000. *Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line*. *Biotechnology progress* 16(5): 859-865.
19. Merten, O.W., Cruz, P.E., Rochette, C., Geny-Fiamma, C., Bouquet, C., Goncalves, D., Danos, O. and Carrondo, M.J.T. 2001. *Comparison of different bioreactor systems for the production of high titer retroviral vectors*. *Biotechnology progress* 17: 326-335.
20. Wu, S.C., Huang, G.Y.L. and Liu, J.H. 2002. *Production of Retrovirus and Adenovirus Vectors for Gene Therapy: A Comparative Study Using Microcarrier and Stationary Cell Culture*. *Biotechnology progress* 18(3): 617-622.
21. Varani, J., Fligiel, S.E.G., Inman, D.R., Beals, T.F. and Hillegas, W.J. 1995. *Modulation of adhesive properties of DEAE-dextran with laminin*. *Journal of biomedical materials research* 29(8): 993-997.
22. LaFlamme, S.E., Akiyama, S.K. and Yamada, K.M. 1992. *Regulation of fibronectin receptor distribution*. *Journal of Cell Biology*: 437-447.
23. Weisz, O.A. and Schnaar, R.L. 1991. *Hepatocyte adhesion to carbohydrate-derivatized surfaces. II. Regulation of cytoskeletal organization and cell morphology*. *Journal of Cell Biology* 115(2): 495-504.
24. Bereiter-Hahn, J., Luck, M., Miebach, T., Stelzer, H.K. and Voth, M., *Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements*. 1990. 171-188.
25. Clark, J., Hirstenstein, H. and Gebb, C. 1980. *Critical parameters in the microcarrier culture of animal cells*. *Developments in biological standardization* 46: 117-124.
26. Hu, W.S., *Cell and Tissue Reactor Engineering: an advanced course in bioprocessing*. 2003. University of Minnesota.
27. Biosciences, A. 2005. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*. 1st ed. Uppsala: GE Healthcare. 172 p.
28. Biosciences, A. 2000. *Microcarrier Cell Culture: Scale-Up Methods*. 1st ed. Uppsala: Amersham Biosciences AB. 28 p.

29. Martens, D.E., Nollen, E.A.A., Hardeveld, M., Velden-de Groot, C.A.M., Gooijer, C.D., Beuvery, E.C. and Tramper, J. 1996. *Death rate in a small air-lift loop reactor of vero cells grown on solid microcarriers and in macroporous microcarriers*. Cytotechnology 21(1): 45-59.
30. Sanford, K.K., Earle, W.R., Evans, V.J., Waltz, H.K. and Shannon, J.E. 1951. *The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei*. Journal of the National Cancer Institute 11(4): 773-795.
31. Preissmann, A., Wiesmann, R., Buchholz, R., Werner, R.G. and Noe, W. 1997. *Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers*. Cytotechnology 24(2): 121-134.
32. Kennard, M.L. and Piret, J.M. 1995. *Membrane anchored protein production from spheroid, porous, and solid microcarrier Chinese hamster ovary cell cultures*. Biotechnology and bioengineering 47(5): 550-556.
33. Keegan, J.M., *Cell Scale-Up and Infection for the Production of Adenoviral Gene Therapy Vectors*, in *Viral Vectors and Vaccines*, T.W.B. Foundation, Editor. 1999: Williamsburg, VA.
34. Nadeau, I. and Kamen, A. 2003. *Production of adenovirus vector for gene therapy*. Biotechnology advances 20(7-8): 475-489.
35. Hu, W.S., Meier, J. and Wang, D.I.C. 1985. *A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers*. Biotechnology and bioengineering 27: 585-595.
36. Warnock, J.N., Merten, O.W. and Al-Rubeai, M. 2006. *Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes*. Cytotechnology 50(1): 141-162.
37. Kamen, A. and Henry, O. 2004. *Development and optimization of an adenovirus production process*. The Journal of Gene Medicine 6 Suppl 1: S184-192.
38. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., W.W., W. and Prasher, D.C. 1994. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263: 802-805.
39. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. 1995. *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends in biochemical sciences 20(11): 448-455.
40. Gerdes, H.H. and Kaether, C. 1996. *Green fluorescent protein: applications in cell biology*. FEBS letters 389(1): 44-47.
41. Côté, J., Bourget, L., Garnier, A. and Kamen, A. 1997. *Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring*. Biotechnology progress 13(6): 709-714.
42. Gilbert, R., Garnier, A., Jacob, D. and Kamen, A. 2000. *On-line measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production*. Biotechnology letters 22: 561-567.

43. Lecina, M., Soley, A., Gracia, J., Espunya, E., Lazaro, B., Cairo, J.J. and Godia, F. 2006. *Application of on-line OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors*. Journal of biotechnology 125(3): 385-394.
44. Zhang, S., Thwin, C., Wu, Z., Cho, T. and Gallagher, S. 2001. *An improved method for the production and purification of adenoviral vectors*. European Patent EP1135469.
45. Irish, T., Bakker, W., Friesner, B., Abraham, G., Tuijn, C., Lardenoije, R. and Etchberger, K. 2000. *A Comparative Study of Large-Scale Production Strategies Used to Produce RCA Free Adenovirus Preparations in Serum-Free Media*. JRH Bioscience.
46. Schoofs, G., Monica, T.J., Ayala, J., Horwitz, J., Montgomery, T., Roth, G. and Castillo, F.J. 1998. *A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy*. Cytotechnology 28: 81-89.
47. Mittereder, N., March, K.L. and Trapnell, B.C. 1996. *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy*. Journal of virology 70(11): 7498-7509.

5. PRODUCCIÓ

5. PRODUCCIÓ

Un cop enllestit el capítol anterior, centrat en determinar les característiques bàsiques de les línies cel·lulars productores (selecció del candidat, de les condicions i del medi de cultiu òptims), així com dels vectors adenovirals (selecció dels paràmetres d'infecció òptims), el disseny del bioprocés continua abordant, en primer lloc, l'optimització de l'etapa de producció.

La producció té com a punt de partida la seva implementació íntegra utilitzant la línia cel·lular HEK293S. Aquesta no només ofereix els millors resultats d'infectivitat, sinó que també incorpora els avantatges del cultiu no adherent al bioprocés amb la concentració homogènia de cèl·lules, nutrients i producte en el volum, la qual facilitarà aspectes tan importants com la manipulació, per exemple en etapes de canvi d'escala; a banda d'altres aspectes igualment importants com són el seu monitoratge i control [1-3].

Sense considerar les etapes preparatives dels bancs cel·lular i víric per disposar dels materials biològics inicials, l'operació unitària principal en la que se centra el present capítol és la de bioreacció. Com ja s'ha comentat a la introducció, aquesta consta de dues fases: la fase de creixement o d'acumulació cel·lular i la fase d'infecció amb l'adenovirus [4].

Amb l'objectiu principal d'optimitzar ambdues fases i d'obtenir suficients quantitats de producte com per satisfer les necessitats de mercat prèviament establertes, però sense oblidar els aspectes econòmics i de normativa, es fa imprescindible abordar l'anàlisi dels tres factors fonamentals que hi intervenen en l'operació de bioreacció: el monitoratge, l'estratègia i el sistema de producció (bioreactor).

5.1. Monitoratge de producció

El monitoratge és un aspecte fonamental del procés de producció de vectors adenovirals, ja que la correcta implementació pot millorar ostensiblement el rendiment de l'etapa i facilitar-ne el control, tot indicant de forma qualitativa o quantitativa si el comportament del cultiu durant les fases de creixement i/o infecció s'està donant de forma consistent, reproducible i amb èxit. Els primers treballs sobre el monitoratge de processos productius amb infecció viral sorgeixen a partir d'estudis del cultiu de la línia d'insecte Sf9 i la seva infecció amb baculovirus [5-13]. No va ser fins l'any 1997 que Côté i col. van publicar el primer treball sobre el monitoratge de la infecció amb adenovirus, el qual va aprofundir sobre la caracterització de la cinètica d'infecció [14].

El monitoratge de la producció es basa en la implementació d'una sèrie de metodologies per a la mesura i el seguiment de dos grups de variables. A grans trets, el primer el conformen variables normalment de tipus fisicoquímic (pH, temperatura, oxigen dissolt, ...) amb metodologies de mesura consolidades. El segon està compost per certes variables, les quals no disposen de sistemes de mesura universals, però que, a canvi, subministren informació molt valuosa sobre l'estat de les dues fases que integren la producció, i faciliten el desenvolupament de possibles estratègies de control. Així, en la fase de creixement destaca la concentració de certs metabòlits (substrats, com la glucosa o la glutamina, i subproductes, com el lactat o l'amoni), encara que la variable principal és la concentració cel·lular. En canvi, durant la fase d'infecció es determina la concentració vírica o títol víric, gràcies a la detecció, sempre que sigui possible, del transgen incorporat al genoma viral. També es poden aprofitar algunes variables emprades durant la fase de creixement, ja que detecten els efectes del cicle infectiu a través del comportament de la cèl·lula.

Un resum de les principals metodologies publicades per al seguiment de les fases que componen el procés de producció, així com de les variables que mesuren, queda recollit a la Taula 5.1.

En aquesta s'observen dues categories de mètodes: els directes i els indirectes. Els mètodes directes engloben un conjunt de tècniques que mesuren directament propietats físiques de la cèl·lula o del virus; en canvi, els mètodes indirectes consisteixen en tècniques que avaluen la resta de paràmetres derivats del creixement cel·lular o de la infecció vírica, com per exemple la variació en l'activitat cel·lular o en el comportament metabòlic. D'altra banda, segons la configuració del sensor que realitzi la mesura es pot parlar de mètodes fora de línia (*off line*), on aquesta s'obté en un equip extern, prèvia extracció manual de mostra i posterior tractament; mètodes en línia amb sensor *in situ* (*in line*), on la mesura s'adquireix a temps real i el sensor es troba situat a l'interior del sistema de cultiu, en contacte físic amb el medi; i mètodes en línia amb sensor *ex situ* (*on line*), on la mesura també s'adquireix a temps real, però requereix una extracció automatitzada de la mostra per transportar-la de forma asèptica fins al sensor que es troba acoblat al sistema de cultiu i no directament en el seu interior [15].

	Mètode		Variable	Referència
Fase de creixement				
Mètodes directes	Absorbància i/o dispersió	In line	Concentració cel·lular	[16, 17]
	Impedància	In line	Concentració cel·lular	[18, 19]
	Microscòpia in situ	In line	Concentració cel·lular	[20]
	Capacitància	In line	Concentració cel·lular	[21]
Mètodes indirectes	Velocitat de consum d'oxigen (OUR)	In/On line	Activitat cel·lular	[22]
	Velocitat de producció de CO ₂ (CER)	In/On line	Activitat cel·lular	[23]
	Anàlisi de metabòlits	Off/In/On line	Activitat cel·lular	[24-28]
Fase d'infecció				
Mètodes directes	Mesura de partícules totals / infectives	Off line	Concentració viral	[14, 29, 30]
	Fluorescència	In line	Concentració viral	[31]
Mètodes indirectes	Citometria de flux	Off line	Concentració cel·lular	[32]
	Capacitància	In line	Concentració cel·lular	[9]
	Velocitat de consum d'oxigen (OUR)	In/On line	Activitat cel·lular	[8, 11-13]
	Impedància (mida cel·lular)	In line	Activitat cel·lular	[33]
	Oxigen Dissolt (OD o pO ₂)	In line	Activitat cel·lular	[33]
	Anàlisi de metabòlits	Off/In/On line	Activitat cel·lular	[5, 6, 10]

Taula 5.1. Recull dels principals mètodes per al monitoratge de les fases de creixement i infecció en el procés de producció de vectors adenovirals.

Menció a part requereixen les mesures de concentració cel·lular i de viabilitat obtingudes fora de línia a través del mètode de recompte cel·lular (descriu a l'apartat 9.7.1.1 del capítol de materials i mètodes), ja que s'utilitzen com a referència per poder contrastar les diferents tècniques que mesuren la concentració cel·lular, com es veurà en els experiments.

Davant l'ampli ventall d'alternatives tabulades, es pot deduir que no existeix un únic mètode emprat universalment. De manera que, moltes vegades és possible optar per una combinació de mètodes directes i indirectes per incrementar la informació que s'extreu del procés.

Amb l'augment d'escala, es tendeix a simplificar el monitoratge en un intent de fer més robust el procés. En aquest sentit, resulten especialment interessants aquells mètodes que monitoren la fase de creixement i la fase d'infecció, sense dependre del transgen. Si bé en ocasions, sobretot durant el desenvolupament del bioprocés, aquest pot resultar marcador per facilitar-ne la detecció (per exemple, emprant la fluorescència emesa per la proteïna GFP), aquest fet no serà una constant en la majoria dels casos, on el marcador pot no estar present en l'etapa de producció definitiva. Dins d'aquest context, Monica i col. realitzen un estudi comparatiu d'alguns dels mètodes descrits a la taula anterior i, finalment, ressalten per sobre de la resta la utilitat dels mètodes de capacitància i de mesura de la velocitat de consum d'oxigen, degut al seu disseny en línia que proporciona dades fiables sobre l'evolució del procés [33].

Tenint en compte aquest antecedent i donada l'experiència prèvia acumulada al grup de recerca, plasmada en treballs anteriors sobre cultiu d'hibridomes [34] i cèl·lules d'insecte Sf9 [35], es decideix emprar la mesura de la velocitat de consum d'oxigen com a única tècnica de monitoratge en línia. A banda d'implementar aquesta opció, també es farà un seguiment fora de línia del principal substrat (glucosa) i el principal subproducte (lactat) per analitzar el comportament metabòlic del procés, de la mateixa manera que es realitza al capítol anterior. Finalment, per quantificar la concentració vírica fora de línia també s'aplicarà el protocol de citometria desenvolupat per Côté i col., tot aprofitant l'expressió de la proteïna GFP [14].

5.1.1. Velocitat de consum d'oxigen

El mètode de monitoratge basat en la mesura de la velocitat de consum d'oxigen (OUR) determina la concentració cel·lular indirectament, a través de la mesura de l'activitat fisiològica de les cèl·lules en el cultiu, sempre i quan no es doni cap limitació o inhibició en aquest com perquè es mantingui constant el valor de consum específic d'oxigen per part de les cèl·lules.

En general, els mètodes utilitzats per determinar la OUR es divideixen en dos grups:

- Mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen a la fase gas: aquest grup es basa en el càlcul de la OUR a partir de la diferència en la concentració d'oxigen entre els corrents de gasos d'entrada i de sortida del bioreactor. Les mesures en línia es realitzen a

partir de costosos equips com analitzadors de gasos [36] o espectròmetres de masses [37, 38]. En general, aquests mètodes es caracteritzen per presentar una sensibilitat limitada a baixa concentració cel·lular.

- Mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen a la fase líquida: aquest grup es va desenvolupar abans que l'anterior, i només requereix l'ús de sensors convencionals per mesurar l'oxigen dissolt en el medi de cultiu. Tanmateix, cal que els mètodes siguin aplicats d'acord amb un protocol, el més estès dels quals dona lloc a l'anomenada tècnica dinàmica.

El seu principi bàsic, consisteix en aturar periòdicament el subministrament d'oxigen al bioreactor per un temps limitat i calcular la OUR a partir del descens temporal de la concentració d'oxigen dissolt, fonamentalment causat per la respiració cel·lular.

Per tal d'aplicar la tècnica dinàmica per a la determinació de la OUR, cal tenir present una sèrie de limitacions que presenta [34]:

- No proporciona un senyal continu. Cal una seqüència d'accions repetida periòdicament a intervals de temps regulars.
- Provoca distorsions en l'operació habitual i en el perfil d'oxigen dissolt del cultiu.
- Suposa que el coeficient volumètric de transferència de matèria per a l'oxigen ($k_L a$) i la constant de la llei de Henry (H) són constants al llarg del cultiu. Tot i que això és bàsicament una aproximació, ja que estrictament ambdues dades poden variar degut a canvis en la reologia del medi. Tanmateix, en cultius cel·lulars com els que es tracten aquesta aproximació se sol acomplir amb certa fiabilitat [39].

En concret, el protocol per mesurar la OUR emprant la tècnica dinàmica requereix una sèrie d'etapes que es detallen a continuació:

1. Donat que el valor de consigna d'oxigen dissolt durant tots els cultius del present treball és del 50% de saturació, per començar s'augmenta fins al 60%.
2. S'interromp el subministrament normal de gasos (aire/N₂/CO₂) a través del sistema d'aeració.
3. S'introdueix un corrent de nitrogen per l'espai de caps del bioreactor per esgotar l'oxigen en la fase gas.
4. Es registren les lectures d'oxigen dissolt des del nivell d'oxigen del 50% fins que el valor es troba per sota del 30% de saturació. La disminució de l'oxigen dissolt en aquest període es deu al seu consum per part de les cèl·lules i a la desorció de l'oxigen de la fase líquida cap a la fase gas.

5. Es tanca l'entrada de nitrogen gas una vegada s'ha assolit el 30% de la saturació d'aire.
6. Es restableix el subministrament de gasos a través del sistema d'aeració, i es recupera la consigna d'oxigen dissolt normal del procés.
7. Es calcula la OUR a partir de les dades del descens d'oxigen dissolt vers el temps i del balanç de matèria d'oxigen al bioreactor, convenientment resolt tal i com es mostra a la següent expressió, on es considera que l'entrada de l'esmentat gas durant el temps que dura el protocol és nul·la:

$$OUR = \frac{C_{O_2}(t_0) - C_{O_2}(t_f)}{t_f - t_0} - \frac{\int_{t_0}^{t_f} (K_{des} \cdot C_{O_2}(t)) dt}{t_f - t_0}$$

Equació 5.1. Expressió per al càlcul de la OUR mitjançant la tècnica dinàmica, on: C_{O_2} és la concentració d'oxigen en la fase líquida, K_{des} és el constant de desorció, t_0 és el temps inicial on comença el protocol, t_f és el temps final on acaba el protocol.

Bàsicament, l'equació anterior recull com la OUR, és a dir, el consum d'oxigen per part de les cèl·lules, resulta de restar el terme relacionat amb la desorció de l'oxigen a la seva variació total durant el descens.

El terme de desorció queda representat per la constant de desorció (K_{des}), la qual ha d'ésser determinada prèviament al cultiu, en necessitar d'un experiment independent. En aquest, s'aplica un protocol idèntic al descrit per a la determinació de la OUR; no obstant, el bioreactor es troba en les condicions operacionals, però només omplert amb medi de cultiu. Sota aquestes circumstàncies, l'Equació 5.1 es pot tornar a reescriure de forma diferencial i sense terme de consum com:

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = -K_{des} \cdot C_{O_2}(t)$$

Equació 5.2. Expressió per determinar la constant de desorció (K_{des}), on: C_{O_2} és la concentració d'oxigen en la fase líquida.

La K_{des} s'avalua, doncs, a partir del pendent que sorgeix en linealitzar l'expressió anterior amb valors logarítmics del perfil d'oxigen dissolt vers el temps, entre els mateixos límits on es determina la OUR (50% i 30% de saturació).

Per demostrar la validesa de la OUR com a tècnica de monitoratge, cal portar a terme la seva implementació, amb mesures periòdiques cada 3 h, en un cultiu sense infecció en bioreactor de 2 L emprant la línia cel·lular HEK293S i el medi 293 SFMII en condicions òptimes. El resultat d'aquest experiment es mostra a la Figura 5.1.

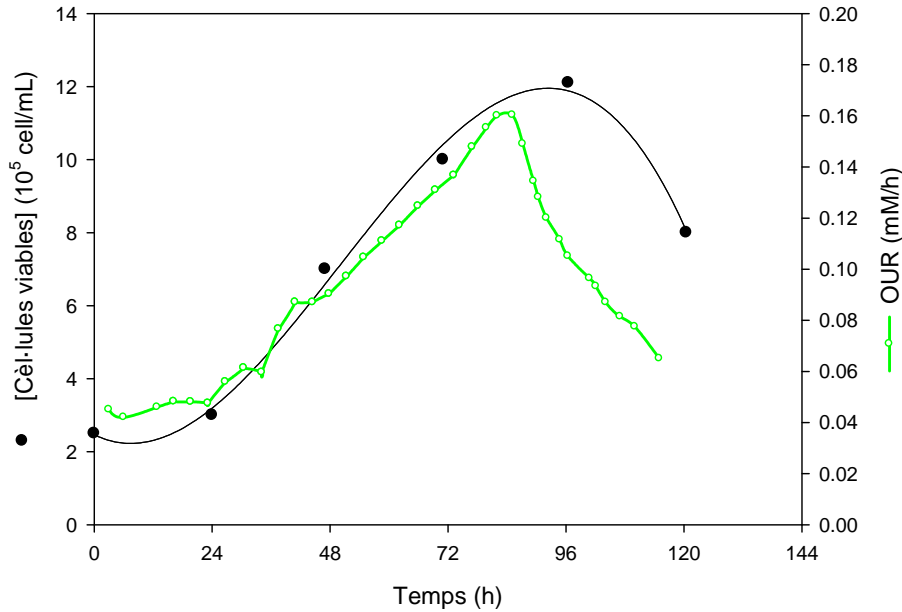


Figura 5.1. Implementació del monitoratge en línia del cultiu de HEK293 en bioreactor: perfils de concentració de cèl·lules viables (●) i OUR (—).

El perfil de concentració de cèl·lules viables comprèn les quatre fases del creixement cel·lular de forma clara: latència, creixement exponencial, estacionària i mort, les quals són monitorades de forma molt fidel per la mesura de la velocitat de consum d'oxigen.

A l'inici, el valor de la OUR és molt reduït (0,045 mM/h), degut a la baixa concentració cel·lular d'inòcul de $2,5 \cdot 10^5$ cell/mL. A partir d'aquest moment, la corba de OUR evoluciona paral·lelament a la de densitat cel·lular, mostrant una bona correlació fins al final de la fase exponencial, aproximadament a les 85 h de cultiu, on la OUR assoleix el seu valor màxim de 0,16 mM/h. Posteriorment, decau abruptament fins al final de l'experiment. En canvi, la concentració cel·lular assoleix el seu màxim de $12 \cdot 10^5$ cell/mL a les 96 h, 11 h més tard que la OUR.

Tot i que inicialment es podria criticar aquesta diferència de comportament entre la OUR i la densitat cel·lular, cal recordar que la OUR proporciona una mesura en línia de l'activitat de les cèl·lules. És per aquesta raó que pot detectar els canvis fisiològics just en el moment en què es produeixen, de forma més precisa que el recompte cel·lular fora de línia, habitualment utilitzat per seguir l'evolució del creixement. Per tant, la OUR indica el moment on es dona algun tipus de limitació en el cultiu, principalment deguda a l'esgotament del substrat limitant o a la inhibició per part d'algun subproducte, i la seva variació és més sensible que la procedent de les mesures fora de línia de concentració cel·lular. Aquest avantatge es pot traduir en actuacions correctores sobre el bioreactor més ràpides i acurades, tot augmentant la robustesa del sistema i disminuint els riscos de contaminació en no ser necessari l'extracció de mostres per a la posterior anàlisi.

A la Figura 5.2 es representa, per a les dades de la Figura 5.1, l'evolució de la OUR respecte la concentració cel·lular, per tal de demostrar la proporcionalitat existent al llarg de tot el rang en què la primera s'incrementa.

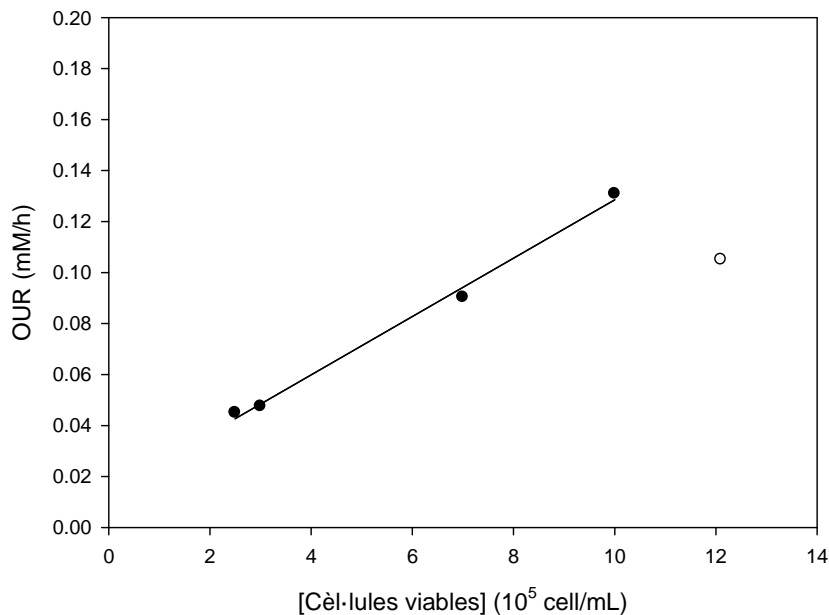


Figura 5.2. Relació entre la mesura de OUR i la concentració de cèl·lules viables en un cultiu en bioreactor. Durant la fase de creixement exponencial (●) es manté una relació lineal, fins que apareix alguna limitació en el cultiu (○) on es perd.

Com es pot observar, durant les fases de latència i de creixement exponencial es manté una relació lineal entre les dues variables, el pendent de la corba es manté constant amb un valor de $130 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$ i equival a la velocitat específica del consum d'oxigen (SOUR o q_{O_2}), la qual es pot expressar com:

$$q_{O_2} = \frac{dOUR}{dX_v}$$

Equació 5.3. Expressió per al càlcul de la velocitat específica del consum d'oxigen (q_{O_2}), on: OUR és la velocitat de consum d'oxigen, X_v és la concentració de cèl·lules viables.

A partir del moment on té lloc la limitació del cultiu, aquesta relació ja no es compleix i la concentració cel·lular deixa de ser directament proporcional a la OUR.

La representació del perfil d'oxigen dissolt durant la fase de creixement del cultiu anterior (entre les 24 h i les 72 h) demostra l'aplicació de la tècnica dinàmica (veure Figura 5.3).

Al comportament oscil·latori de la variable al voltant de la consigna del 50% de saturació, intrínsec als paràmetres de sintonia del controlador, s'afegeixen les perturbacions periòdiques i significatives de caiguda entre el 60% i el 30% de saturació. L'aspecte qualitatiu més important a destacar de les mateixes és l'augment de la velocitat amb la que es produeix la caiguda a mesura que avança el temps, la qual cosa es troba directament relacionada amb l'augment del valor de la OUR.

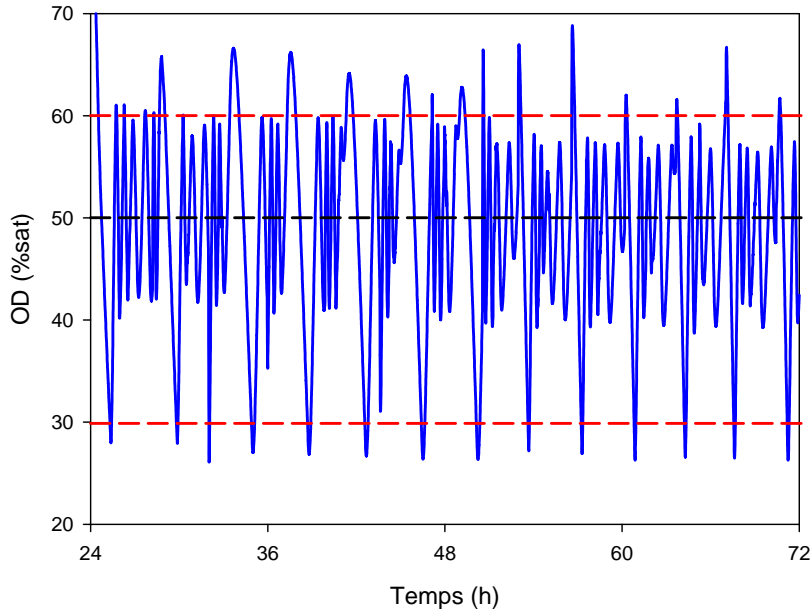


Figura 5.3. Perfil d'oxigen dissolt durant la fase de creixement exponencial del cultiu (24 h – 72 h de cultiu), s'observen les distorsions provocades per la tècnica dinàmica per mesurar la OUR. La línia discontinua negra indica la consigna d'oxigen dissolt del cultiu, mentre que les línies discontinues vermelles indiquen els límits on s'aplica la tècnica.

Finalment, la OUR també ofereix aplicacions destinades exclusivament a la fase d'infecció del procés, per tal d'optimitzar-ne el rendiment global. En aquest sentit, existeixen treballs publicats, com el de Lecina i col., emprant el sistema d'expressió en baculovirus i la línia cel·lular d'insecte Sf9, on s'utilitza la velocitat de consum d'oxigen per a la determinació dels paràmetres clau (TOAs), encara que a costa d'incrementar paral·lelament el grau de tractament matemàtic de les dades obtingudes [40]. En el present treball, davant dels elevats títols vírics de producció (veure capítol d'estudis previs), es decideix no utilitzar aquesta potencial aplicació, en benefici també d'augmentar la robustesa del procés de producció, tot infectant d'acord amb el coneixement previ del comportament del cultiu sense infecció.

5.2. Estratègia de producció

No existeix una única estratègia o mode de producció universalment vàlida per a qualsevol aplicació, ja que cadascuna presenta avantatges i inconvenients, en funció d'una dada tan bàsica com pot ser el nombre de dosis de producte requerides. De manera que, en aquest apartat, cal analitzar les característiques de les principals alternatives i escollir-ne les més adients per a la producció de vectors adenovirals.

Tot i que, les diferents estratègies de producció que es descriuen es troben dissenyades per incidir sobretot en la fase de creixement cel·lular; la fase d'infecció també es veurà fortament afectada, donat que el seu rendiment es relaciona, en bona mesura, amb l'estat fisiològic i metabòlic de les cèl·lules. Per tant, l'estratègia (o estratègies) de producció finalment

seleccionada serà aquella que permeti maximitzar la producció global de partícules víriques. De manera que haurà de permetre assolir i mantenir una elevada densitat de cèl·lules viables, per posteriorment, infectar-les i extreure'n el millor rendiment víric possible.

A la Figura 5.4 es mostra l'esquema de les estratègies tradicionalment emprades en la producció de virus: discontinu, discontinu alimentat, continu amb perfusió i continu amb dues etapes. A continuació es procedeix a la descripció i anàlisi de cadascuna d'elles.

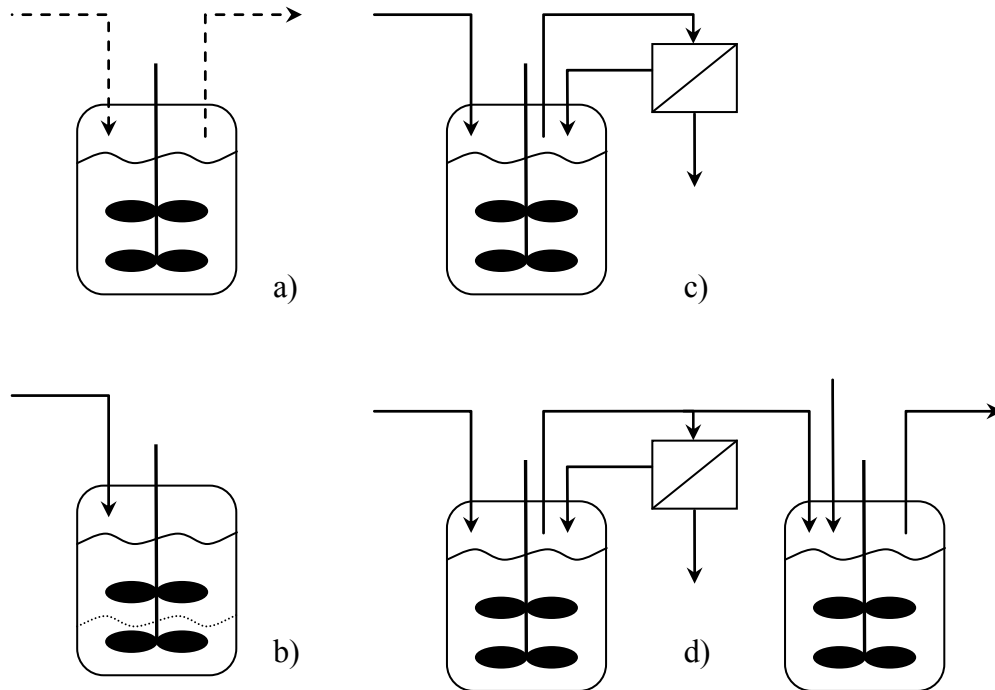


Figura 5.4. Estratègies de producció de vectors adenovirals: a) Discontinuu, els components s'addicionen abans del cultiu; b) Discontinuu alimentat, s'addiciona un corrent d'aliment; c) Continu amb perfusió, s'addiciona un corrent d'aliment i s'extreu corrent de medi exhaurit; d) Continu amb dues etapes. En el cas de a), b) i c), la infecció té lloc en el bioreactor un cop finalitzada la fase d'acumulació cel·lular. En el cas de d), el primer tanc només actua com a factoria cel·lular en perfusió, mentre que la infecció té lloc en el segon.

5.2.1. Producció en discontinuu

L'estratègia de producció en discontinuu (*batch*) es distingeix per la seva simplicitat, alta versatilitat, baix cost i robustesa, factors que fan d'aquesta la més emprada en la majoria de processos biotecnològics per a l'obtenció de qualsevol biofàrmac i, si s'escau, el sistema de referència escollit per comparar alternatives durant el desenvolupament i optimització de qualsevol bioprocés. El seu principal desavantatge és inherent a la simplicitat, donat que no permet actuar sobre cap element per millorar l'eficiència del procés, tret del rendiment característic de la línia cel·lular, del vector adenoviral i del medi de cultiu. També sol ser considerada una estratègia de baixa productivitat, donat que no s'assoleix la concentració cel·lular màxima fins al final del cultiu.

En l'estratègia de producció en discontinuu es carrega el bioreactor amb el medi estèril, s'estableixen les condicions d'operació i s'inoculen les cèl·lules que van creixent al llarg del

temps fins al moment d'infecció. Les actuacions sobre el sistema es limiten a les relacionades amb la correcció de variables com el pH, l'oxigen dissolt o la temperatura d'operació.

És possible que l'adaptació de l'inòcul a les condicions del bioreactor necessiti d'una fase de latència. Habitualment, però, les cèl·lules creixen de forma exponencial seguint la seva corba característica mentre consumeixen nutrients i excreten subproductes metabòlics. En un moment determinat, s'arriba a un màxim de concentració cel·lular i a la posterior estabilització, degut a l'exhauriment d'algun nutrient limitant o a la inhibició per part d'algun subproducte. Segons això i d'acord amb l'objectiu de produir la màxima quantitat de vectors adenovirals, la fase d'infecció s'ha d'iniciar amb la introducció de l'alíquota vírica pura al bioreactor, abans que la fase estacionària del creixement cel·lular s'assoleixi i el biocatalitzador abandoni l'estat fisiològic òptim.

Tot i la disponibilitat de medis de cultiu que permeten assolir una densitat cel·lular final de fins a $50 \cdot 10^5$ cell/mL en la fase de creixement, com s'ha esmentat al capítol anterior, diferents autors publiquen que existeix un estret marge de concentració òptima d'infecció (entre $5 \cdot 10^5$ cell/mL i $10 \cdot 10^5$ cell/mL, en funció del medi de cultiu), a partir del qual la producció vírica cau dràsticament [2, 41-45]. Aquest fenomen es defineix com a efecte de la densitat cel·lular (*cell density effect*), i les raons per les quals té lloc es creu que són degudes a la disponibilitat limitada d'algun nutrient i/o a l'acumulació d'alguna substància inhibidora per a la replicació del virus [2].

Una solució per augmentar la concentració d'infecció fins a $20 \cdot 10^5$ cell/mL consisteix en la modificació de l'estratègia de producció en discontinu, senzillament, amb la introducció d'un recanvi total o parcial del medi exhaurit per medi fresc amb l'inòcul víric, a l'inici de la infecció, el qual pot tornar a ésser recanviat al llarg d'aquesta. Aquesta estratègia s'anomena producció en discontinu seqüencial (*sequential batch*) i es troba àmpliament referenciada a la bibliografia [46-48]. Tot i això, la poca millora aconseguida en la infectivitat, així com, la dificultat tècnica si s'hagués de posar en pràctica a una escala de producció elevada, emprant per exemple centrífugues en continu, descarten la seva avaluació en el present treball.

Una altra alternativa, no explorada a la bibliografia, és l'aplicació d'una estratègia en discontinu fortificada, la qual es realitzaria en un medi de cultiu on els principals nutrients es trobarien a major concentració respecte la present en el procés en discontinu. Per tant, caldria disposar d'un bon coneixement de tots els components que aquest incorpora per evitar una modificació incontrolada que el desbalancegi i, per exemple, doni lloc a un augment excessiu de la seva osmolaritat. D'altra banda, la seva utilització en treballs previs del grup de recerca per al cultiu d'hibridomes i de la línia cel·lular Sf9 demostra la limitada optimització que aporta aquesta variant, degut a les altes concentracions inhibidores de subproductes del metabolisme que s'assoleixen [34, 35]. Aquesta raó, associada al desconeixement de la composició del medi de cultiu comercial 293 SFMII (Invitrogen Corporation) descarta també l'aplicació en el present treball d'aquesta estratègia, variant del *batch*.

5.2.2. Producció en discontinu alimentat

La producció en discontinu alimentat (*fed batch*) es presenta com a alternativa enginyeril més pràctica i fàcilment implementable que el discontinu seqüencial, amb l'objectiu d'augmentar l'escala del procés i superar la limitació de productivitat vírica provocada per l'efecte de la densitat cel·lular.

L'estratègia de producció en discontinu alimentat pretén aprofitar els avantatges del discontinu, però augmenta el seu grau de sofisticació introduint l'addició al sistema d'un cabal continu o intermitent de nutrients per perllongar la fase de creixement del cultiu, de manera que la infecció es porti a terme a densitats cel·lulars superiors amb un estat fisiològic de la cèl·lula òptim que proporcioni productivitats víriques superiors a les obtingudes en discontinu. Degut al fet que no hi ha cap extracció de medi durant l'operació, el volum de líquid al bioreactor s'incrementa progressivament fins que s'arriba al moment d'aturada del procés i posterior recollida per tractar el producte.

La principal dificultat d'aquesta estratègia recau en el desenvolupament del perfil d'addició de nutrients adient per aconseguir els objectius plantejats. Aquest requereix d'un profund coneixement de les necessitats associades al creixement del biocatalitzador, a la vegada que cal determinar aquells nutrients i subproductes que poden limitar o inhibir tant la fase de creixement com la fase d'infecció [1]. Per aquesta raó, la posada a punt del *fed batch* requereix del desenvolupament de controls automatitzats d'addició de nutrients, basats en mètodes de monitoratge com la OUR, que mantinguin una baixa concentració de glucosa i/o glutamina en el cultiu; comportin moderats augments en l'osmolaritat del medi i evitin l'acumulació d'elevades concentracions de lactat i amoni.

Tot i això, les productivitats víriques assolides amb aquest mode no superen aquelles obtingudes en discontinu o en alguna de les seves variants, i les densitats cel·lulars d'infecció només augmenten lleugerament fins a $30 \cdot 10^5$ cell/mL [49-51]. D'altra banda, un cop assolit el màxim volum del sistema, les condicions limitants descrites anteriorment també s'acabaran manifestant. Com a conseqüència, el mode de producció en discontinu alimentat no elimina completament, sinó que retarda les mateixes limitacions que presentava el discontinu [52].

5.2.3. Producció en continu

La producció en continu estalvia la complexa anàlisi del metabolisme que requereix la producció en discontinu alimentat, ja que els nutrients limitants i els diversos subproductes tòxics són adicionats i eliminats de forma constant del sistema, respectivament. De manera que el disseny del procés no requereix d'un perfil d'addició de nutrients previ, però implica una complicació addicional a nivell enginyeril del mateix.

Existeixen dues possibles estratègies de producció en continu emprades en la producció vírica: la producció en continu amb perfusió i amb dues etapes.

5.2.3.1. Perfusió

La producció en continu amb perfusió representa segurament l'expressió enginyeril que més simula l'entorn cel·lular primigeni. Quan formen part d'un teixit, les cèl·lules es troben en unes condicions homeostàtiques perfectament definides, molt ben controlades i regulades, tant a nivell fisicoquímic com metabòlic. Aquest és l'entorn ideal que pretén emular la perfusió, on el cultiu assoleix les densitats cel·lulars més elevades en ésser retingut a l'interior del bioreactor, mitjançant algun tipus d'element físic de separació, mentre s'addiciona medi fresc i se n'extreu d'exhaurit a la mateixa velocitat per mantenir el volum del sistema constant.

Teòricament, augmentant la velocitat de perfusió que és proporcional al cabal d'alimentació, aquesta estratègia podria mantenir el subministrament de nutrients a les cèl·lules i el seu creixement en fase exponencial de forma indefinida. A la pràctica, però, limitacions de tipus tècnic en els elements que integren el bioreactor com el sistema d'aeració, el sistema d'extracció/addició de nutrients (bombes) o l'element de separació, fan que s'assoleixin màxims de densitat cel·lular de l'ordre de $200 \cdot 10^5$ cell/mL i $500 \cdot 10^5$ cell/mL durant períodes d'operació de mesos [53].

Per tal d'augmentar el cabal d'alimentació, l'element de retenció cel·lular ha de permetre l'extracció del medi exhaurit sense problemes per evitar-ne la seva acumulació. Per aquesta raó, esdevé una peça fonamental en l'estratègia. Els dispositius de retenció cel·lular es basen en mètodes de separació sòlid-líquid com la filtració, la sedimentació, la centrifugació i, últimament, la separació ultrasònica [54, 55]. En general, degut al seu baix cost i fàcil operació, existeix una tendència en la indústria biotecnològica d'emprar principalment dispositius basats en mètodes de filtració, els quals permeten convertir els bioreactors que operen en discontinu, en bioreactors en continu amb perfusió d'un forma relativament senzilla i barata [34].

Encara que la perfusió és una estratègia de producció bastant complexa operativament parlant i, per tant, és més susceptible a la contaminació, la seva aplicació en l'obtenció de vectors adenovirals a escala pilot s'ha realitzat amb èxit [52, 55, 56]. Així, cal destacar com Henry i col. superen l'efecte abans esmentat de la densitat cel·lular, ja que aconseguixen infectar cultius amb una densitat de $25 \cdot 10^5$ cell/mL, i obtenir productivitats similars a les del procés en discontinu [55].

5.2.3.2. Dues etapes

Aquesta és una alternativa de l'estratègia de producció en continu on són necessàries dues unitats de cultiu. La primera operant en perfusió com a factoria productora de cèl·lules i connectada a una segona que opera com a unitat d'infecció en continu, tal i com es pot observar a la Figura 5.4d. Per tant, és fonamental fixar un temps de residència a la segona unitat, igual al temps de recollida del virus, i assolir un estat estacionari de funcionament, moment en el qual es pot avaluar la productivitat vírica en continu. Per tant, aquest mode d'operació permet desvincular físicament les fases de creixement i d'infecció, per exemple en casos on s'utilitzin diferents medis de cultiu o es modifiqui alguna variable de control, com

per exemple la temperatura o el pH.

A la bibliografia no es troben referències sobre la producció en continu amb dues etapes per a l'obtenció de vectors adenovirals, probablement degut als seus elevats costos i complexitat operacional, als majors riscos de contaminació no només per al cultiu, sinó també per als operaris i al difícil assoliment d'un cert grau de robustesa en el funcionament. En canvi, per a processos on el nivell de bioseguretat no cal que sigui tan elevat, com per exemple, en la producció de proteïnes heteròlogues emprant el cultiu de la línia cel·lular Sf9 i la posterior infecció amb baculovirus, és una estratègia àmpliament emprada [35].

Després de ponderar els avantatges i desavantatges de totes i cadascuna de les estratègies de producció i en vista dels resultats publicats de producció, en el present treball es decideix optar per la producció en continu amb perfusió, com a estratègia principal i l'estratègia en discontinu, com a referència per comparar les dades obtingudes.

5.3. Sistema de producció: bioreactor

Una vegada avaluats el monitoratge i l'estratègia de producció, l'últim factor que defineix el procés productiu i que es planteja abordar és l'estudi del sistema de producció o bioreactor, particularment comparant dues possibles alternatives.

D'una banda, s'utilitza el sistema tradicionalment més emprat, designat com a sistema convencional, com és el bioreactor de tanc agitat construït amb materials reutilitzables com l'acer o el vidre. De l'altra, el sistema no convencional. De disseny molt més recent, aquest últim es basa en tecnologies d'un sol ús, les quals han irromput amb força en els darrers anys i poden facilitar l'adopció de la normativa GMP per a productes destinats a teràpia humana, com els vectors adenovirals, sempre i quan es demostrï que poden competir en productivitat amb el sistema convencional.

A continuació es discuteixen els resultats obtinguts en ambdós sistemes, emprant els mètodes de monitoratge i les estratègies de producció, en discontinu i en continu amb perfusió, seleccionats. Tal i com s'ha comentat a l'apartat de monitoratge, en no disposar de cap sistema automatitzat per a la detecció del temps d'infecció, només és possible fixar-lo en un punt de la fase de creixement propera al màxim de concentració cel·lular, on el cultiu no es trobi sotmès a cap tipus de limitació. Per això, previ al procés amb infecció, cal determinar experimentalment el comportament de la línia cel·lular en solitari per a cadascun dels sistemes de producció i de les estratègies seleccionades.

5.4. Sistema convencional

Durant més de 40 anys, els sistemes de producció convencionals, basats en el bioreactor de tanc agitat per al cultiu cel·lular, s'han emprat en fases de desenvolupament i de producció a escala industrial. Aquesta tecnologia molt madura es troba altament optimitzada, i es caracteritza sobretot per necessitar d'una inversió substancial, no només en la fabricació de la unitat en sí mateixa, sinó també en les instal·lacions i equips auxiliars necessaris per la seva esterilització, neteja i posterior validació [57].

El bioreactor de tanc agitat emprat és el Biostat Bplus de Sartorius Stedim Biotech (veure Figura 5.5), descrit a l'apartat 9.5.1.3 del capítol de materials i mètodes.



Figura 5.5. Bioreactor de tanc agitat Biostat Bplus (cuba de 2 L i DCU) i ordinador de gestió.

Essencialment, aquest bioreactor d'escala laboratori es compon d'una cuba autoclavable de vidre amb 2 L de capacitat, on té lloc físicament el procés productiu, i de la unitat de control digital (DCU), la qual es connecta a la cuba de bioreacció per propiciar-ne el control a través dels sensors de mesura i dels actuadors (bombes i sistema d'aeració).

La possibilitat de connectar-lo amb un ordinador de gestió, via port sèrie RS-232, incrementa el potencial del sistema convencional, ja que els programaris de control que es desenvolupen actualment agilitzen la supervisió del procés i milloren el seu grau d'automatització.

5.4.1. Programari de control de procés

En la posada a punt de qualsevol procés productiu juga un paper molt destacat la possibilitat d'utilitzar algun programari informàtic (*software*) amb l'objectiu de, com a mínim, controlar, gestionar i documentar tota la informació vinculada a aquesta etapa. Si, com és el cas, també és necessari implementar protocols iteratius (per exemple, el relacionat amb la mesura de OUR), tractar-ne les dades obtingudes i actuar sobre el sistema de forma automàtica en funció dels resultats, aleshores un element així esdevé totalment indispensable.

Tradicionalment, l'àmplia disponibilitat de llenguatges de programació, targetes d'adquisició de dades i de components externs, com bombes, controladors d'aeració, etc..., feia molt assequible el disseny propi d'aplicacions per controlar el bioreactor a partir dels elements que el configuren inicialment. Aquest és el cas concret de l'aplicació SEQUEN desenvolupada pel grup de recerca, utilitzant l'entorn LabWindows/CVI per gestionar i actuar sobre el procés productiu [34].

Tanmateix, la necessitat de complir amb la normativa GMP per a processos de producció obliga a escollir *softwares* comercials totalment validables. Els programaris es dissenyen per complir amb la norma 21 CFR part 11 (2003) de la FDA, que defineix el criteri sota el qual les signatures i els registres electrònics són considerats fidedignes i equivalents als registres en paper; o per complir amb la seva equivalent europea, la Eudralex Volume 4 apèndix 11 (2008), promulgada per la EMEA, sobre la documentació en sistemes informàtics.

Aquest és el cas del paquet de *software* MFCS/win 3.0 (Sartorius Stedim Biotech), el qual es troba específicament desenvolupat per al bioreactor de tanc agitat descrit, i comercialitza juntament amb aquest. És, doncs, l'usuari qui ha d'adaptar les seves necessitats a l'entorn de programació que aquest proporciona, i no al contrari.

5.4.1.1. Descripció

El MFCS/win 3.0 és un programari de control i adquisició de dades (SCADA) dissenyat per a processos biotecnològics de producció, compatible amb la normativa GMP. Es tracta d'un *software* amb arquitectura modular client/servidor, és a dir, la seva estructura i funcionalitats queden dividides en diversos mòduls: aquells amb els quals l'usuari hi té interacció esdevenen els anomenats mòduls-client; mentre que, els mòduls-servidor són aquells que s'executen independentment de l'usuari de forma automàtica, com per exemple els mòduls de comunicació amb el bioreactor, d'emmagatzematge de dades o d'execució de càlculs, entre d'altres.

Per accedir als mòduls-client existeix una interfície d'usuari anomenada *MFCS Shell* que els agrupa, i permet la seva execució en qualsevol moment. Aquests mòduls-client són els següents:

- *Operator Service*: proporciona una visió general en un determinat moment dels paràmetres relacionats amb el procés actiu (variables mesurades, consignes de control, alarmes, etc...).
- *Batch Management*: permet la gestió de tots els processos, tant aquells que ja s'han portat a terme, com els que ho estant fent, i permet planificar-ne de nous.
- *Sample Data Management*: les dades fora de línia obtingudes al llarg del procés poden ésser introduïdes al sistema, analitzades i representades gràficament, gràcies a aquest mòdul.
- *Plotting*: aquesta utilitat proveeix de la representació gràfica de fins a 10 variables de procés, i de la seva actualització a temps real.

- *Reporting*: permet la generació d'informes a partir de dades adquirides.
- *Configuration Management*: aquest mòdul administra la connexió de tots els elements físics que poden interactuar amb el procés. A més, permet la creació i la modificació dels paràmetres que es relacionen amb seu el control: variables i constants, càlculs i fórmules (realitzades en línia o fora de línia), pantalles de visualització (*displays*), perfils d'addició i receptes.

Precisament, les receptes esdevenen l'aspecte més destacable d'aquest mòdul, ja que proporcionen la possibilitat de crear procediments totalment automatitzats d'acord amb el protocol internacional ISA S88 establert per al control de lots de producció.

5.4.1.2. Receptes

Les receptes poden contenir i/o relacionar-se amb tots els elements que integren el mòdul *Configuration Management*, com són les variables, les fórmules, les pantalles de visualització o els perfils d'addició. Per tant, cal que tots aquests paràmetres es trobin definits prèviament a iniciar-ne la seva creació.

D'acord amb el protocol ISA S88, l'estructura general de qualsevol recepta (veure Figura 5.6), es basa en un model integrat per tres elements de procediment bàsics: operacions, fases i transicions.

- Operacions: són les etapes en les que es divideix qualsevol procés, situades en ordre lògic i executades de forma seqüencial (per exemple: SIP, Cultiu, Recollida i CIP). Com a màxim, es disposa de 20 operacions per recepta.
- Fases: són les accions de procés més detallades en les quals es subdivideix cada operació (per exemple, l'operació "Cultiu" es pot subdividir en la fase d'inòcul, la fase d'acumulació cel·lular i la fase de producció). L'execució de les fases es pot realitzar de forma seqüencial (en sèrie) o bé consecutiva (en paral·lel), tot i que també és possible tancar fases en llaços iteratius. Com a màxim, es disposa de 20 fases per operació.

Existeixen dos tipus de fases: la de paràmetres i la de controls. Com el seu nom indica, la fase de paràmetres només conté un o diversos paràmetres com l'activació o desactivació d'una variable o fórmula, el canvi del límit d'una alarma, etc... En canvi, la fase de controls realitza una acció de procés predefinida, com inserir un perfil d'alimentació (*Profile Phase*), retardar el procés un determinat període de temps (*Wait Phase*) o finalitzar obligatòriament l'operació (*End Phase*), entre d'altres.

- Transicions: són les condicions on intervenen operadors de tipus lògic (=,>,<,OR, AND, etc...) que s'han de complir per executar la fase següent (per exemple que l'oxigen dissolt o el pH assoleixin un determinat valor de consigna).

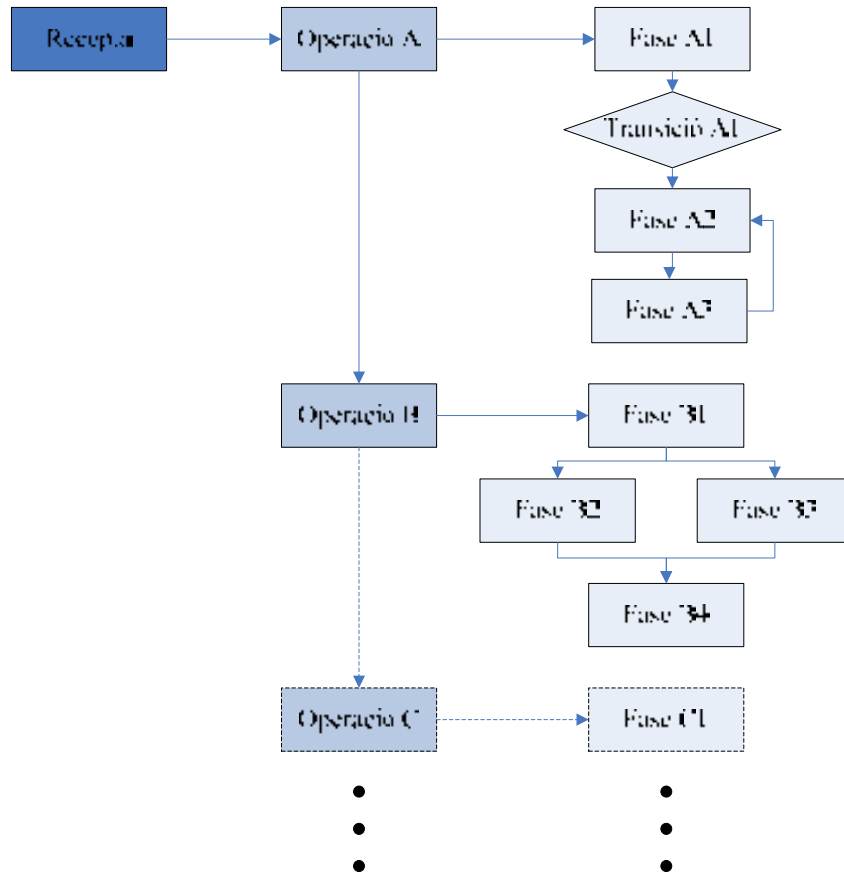


Figura 5.6. Estructura dels principals elements de procediment que componen una recepta, d'acord amb el protocol ISA S88.

Les receptes presenten dues limitacions fonamentals. D'una banda, no es poden definir ni vectors ni matrius per emmagatzemar conjunts de dades, i de l'altra, no es poden incloure subrutines de càlcul en cap fase ni operació. De manera que, tots els càlculs s'han de resoldre en base a l'activació i desactivació de fórmules predefinides.

Per donar a conèixer les solucions proposades a aquestes limitacions, tot seguit es descriu un exemple concret sobre l'aplicació d'aquest programari de control en forma de recepta-model, en el cas de la determinació de la constant de desorció (K_{des}).

5.4.1.3. Recepta per a la determinació de la constant de desorció (K_{des})

Com es descriu a l'apartat 5.1.1, la determinació de la constant de desorció requereix d'un protocol molt similar al descrit per a la determinació de la OUR. Per tant, es pot avaluar el seu valor a partir del pendent que sorgeix de linealitzar l'Equació 5.2 amb els valors logarítmics del perfil d'oxigen dissolt vers el temps, entre els mateixos límits que es determina la OUR (50% i 30% de saturació).

La recepta KDES es programa amb aquest objectiu. A la Figura 5.7, es mostren les tres operacions que la integren; mentre que a la Taula 5.2, es descriuen les fases i transicions que conformen cadascuna d'aquestes.

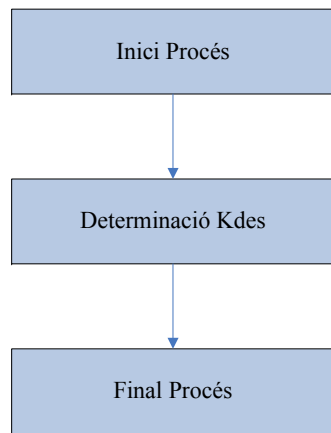
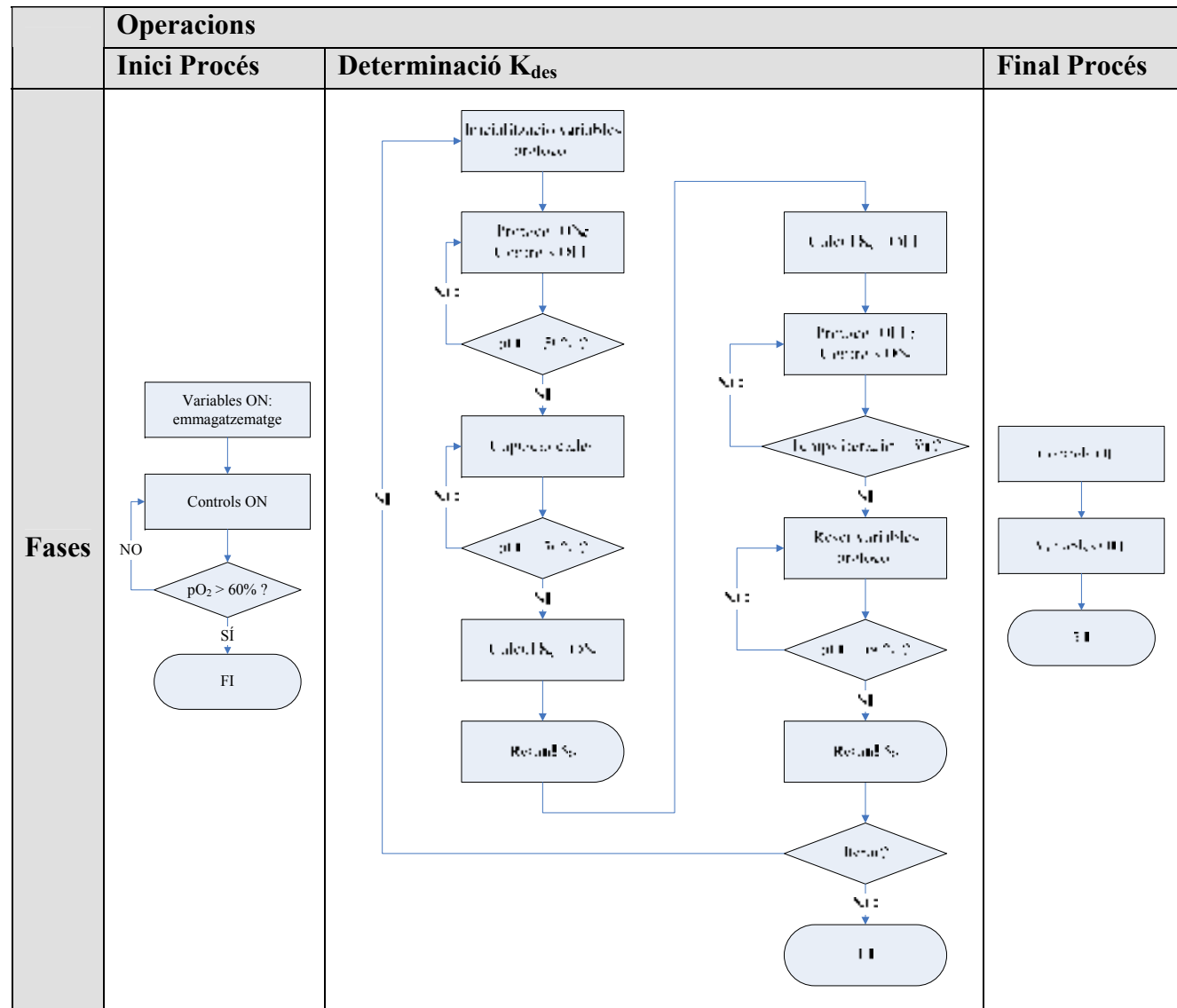


Figura 5.7. Diagrama d'operacions que componen la recepta KDES.



Taula 5.2. Diagrama de flux de les fases/transicions que integren cadascuna de les operacions de la recepta KDES.

Es procedeix a realitzar una explicació de cadascuna de les operacions, tot i que una descripció molt més detallada de la recepta es troba a l'apartat 10.1.1 del capítol d'apèndix:

- Operació “Inici Procés”: durant aquesta operació s'utilitzen dues fases de paràmetres consecutives. La primera fase serveix per activar l'emmagatzematge de les variables que s'utilitzen durant la recepta, i la segona activa els llaços de control necessaris (temperatura, oxigen dissolt i agitació) i fixa les consignes. Posteriorment se situa una transició per assegurar que la primera davallada d'oxigen començarà per sobre del 60% de saturació i, finalment, la fase de control per concloure l'operació.
- Operació “Determinació Kdes”: aquesta operació recull les fases més importants del protocol iteratiu. A grans trets, s'activa la caiguda d'oxigen, es capten dades entre el 50% i el 30% de saturació, es calcula el valor de la constant i es recuperen les consignes de control inicial fins a la següent iteració que es dona cada 3 h.

Degut a les limitacions abans mencionades, durant la fase “Càlcul Kdes ON” no és possible cridar una subrutina que calculi la constant de desorció, utilitzant l'expressió per a la determinació del pendent d'una recta (veure Equació 5.4), a partir de vectors que continguin dades emmagatzemades.

$$pendent = K_{des} = \frac{n \cdot \sum_i (t_i \cdot \ln(pO_{2,i})) - \sum_i t_i \cdot \sum_i \ln(pO_{2,i})}{n \cdot \sum_i t_i^2 - \left(\sum_i t_i \right)^2}$$

Equació 5.4. Expressió per a la determinació del pendent d'una recta, on: n és el nombre de dades, t és el temps, pO₂ és el valor d'oxigen dissolt.

Com a alternativa, s'estudia l'Equació 5.4 i s'observa que depèn de quatre sumatoris que es poden tractar com a variables independents. De manera que, prèviament, a la fase “Captació dades”, s'activen les fórmules que els calculen tots quatre, actualitzant-los de forma contínua, a mesura que es capten noves dades de temps i oxigen dissolt. Quan aquest últim és menor del 30%, s'activa una fórmula simple per calcular la constant de desorció, es deixa un retard de 5 s per assegurar el seu emmagatzematge i s'atura el càlcul a la fase “Càlcul Kdes OFF”. A la Taula 5.3, es mostren detalladament les variables i els càlculs que integren les fases “Captació dades” i “Càlcul Kdes ON/OFF”, en relació amb l'equació anterior.

Finalment, per assolir la tercera i última operació, l'usuari modifica la variable de la transició “Iterar” amb el valor NO, i s'accedeix a la fase de control per concloure aquesta operació.

- Operació “Final Procés”: se situen les fases oposades a l'operació “Inici Procés”, on s'aturen tots els controls i l'emmagatzematge de les variables que s'utilitzen a la recepta.

Fase	Variable	Variable MFCS/win	Fórmula	Càlcul
Captació dades	t	BatchAge	-	-
	n	contador	Formula contador	contador = contador + 1
	$\sum_i t_i$	sumt	Formula sumt	sumt = sumt + BatchAge
	$\sum_i \text{Ln}(pO_{2,i})$	sump02	Formula sump02	sump02 = sump02 + Ln(p02)
	$\sum_i (t^2)_i$	sumt2	Formula sumt2	sumt2 = sumt2 + BatchAge^2
	$\sum_i (t_i \cdot \text{Ln}(pO_{2,i}))$	sump02t	Formula sump02t	sump02t = sump02t + Ln(p02)* BatchAge
Càlcul Kdes ON/OFF	K _{des}	kdes	Formula kdes	kdes = (contador*sump02t - sumt*sump02) / (contador*sumt2 - sumt^2)

Taula 5.3. Principals variables i càlculs presents en les fases “Captació de dades” i “Càlcul Kdes ON/OFF” de la recepta KDES.

5.4.2. Producció en discontinu

5.4.2.1. Descripció de la producció en discontinu

Els elements del sistema convencional descrits s'integren d'acord amb el muntatge experimental de la Figura 5.8, visible de forma esquematitzada a la Figura 5.9, per operar amb l'estratègia en discontinu.



Figura 5.8. Sistema convencional (bioreactor Biostat Bplus): muntatge experimental operant en discontinu.

Un cop efectuada la inoculació del bioreactor, es procedeix a activar els llaços de control de les principals variables (temperatura, agitació, pH i oxigen dissolt) directament via la DCU. Per facilitar el creixement del cultiu, l'aeració es realitza a través de la membrana tubular de silicona, descrita dins de l'apartat 9.5.1.4 del capítol de materials i mètodes. L'avantatge principal d'aquest dispositiu és que la transferència d'oxigen no es produeix de forma directa: la sobrepressió de 0.5 bar aplicada a la membrana fa que aquesta s'infla, i forci l'oxigen a difondre a través dels porus. D'aquesta manera, es redueix l'estrès que el bombolleig directe pot provocar sobre el cultiu. Malgrat tot, la capacitat d'aportació d'oxigen és reduïda, tot i que no limitant per a les concentracions que s'assoleixen en els cultius en discontinu [34].

En el moment que les variables de control són estables, es procedeix a activar el sistema MFCS/win 3.0, es comprova la correcta comunicació entre el bioreactor i l'ordinador de gestió i s'executa la recepta BATCH, la qual conté les ordres de control necessàries per mantenir el procés operant de forma automatitzada amb l'aplicació de la tècnica dinàmica per determinar la OUR de forma iterativa, cada 3 h, al llarg del cultiu.

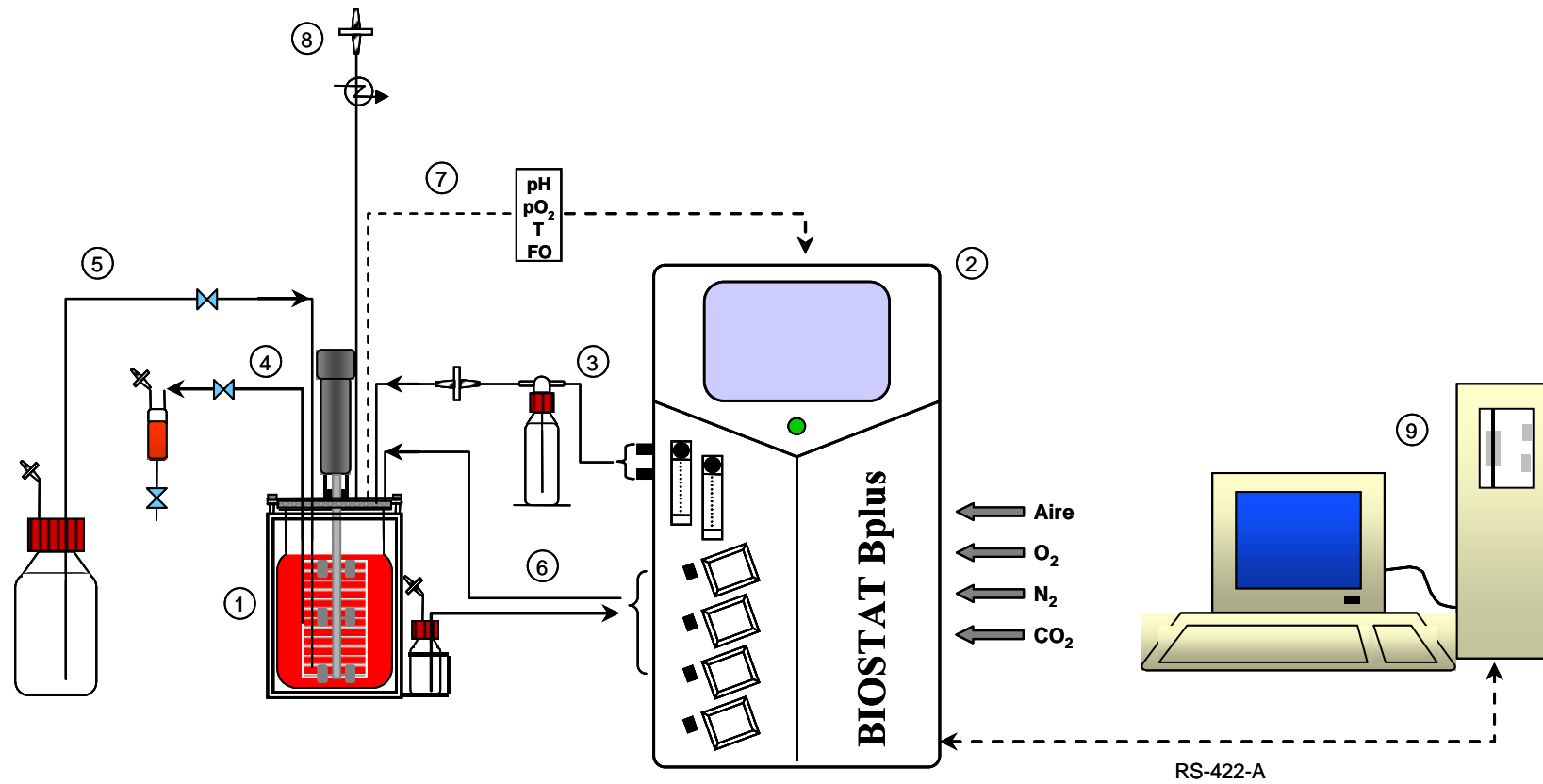


Figura 5.9. Sistema convencional: esquema del muntatge experimental operant en discontinu. 1) Cuba del bioreactor (2 L); 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos; 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 4) Presa de mostra manual; 5) Circuit d'inoculació; 6) Circuit d'addició d'àcid, de base i d'antiescumejant; 7) Sondes de temperatura, pH, pO₂ i de detecció d'escumes; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Ordinador de gestió i control.

A la Figura 5.10 i la Taula 5.4, es presenta el diagrama de flux de la recepta BATCH amb les tres operacions que la conformen, juntament amb les fases que integren cadascuna d'aquestes:

- Operació “Inici Procés”: la componen dues fases de paràmetres consecutives, la primera serveix per començar a emmagatzemar les variables que s'utilitzaran a la recepta i la segona activa els llaços de control del cultiu i les seves consignes (temperatura, pH, oxigen dissolt i agitació). Posteriorment, se situa una transició per assegurar que el protocol de mesura de la OUR començarà per sobre del 60% de saturació. Finalment, es conclou l'operació amb la fase de control.
- Operació “Procés DISCONTINU”: aquesta recull les accions principals del procés.

Comença activant el protocol per posar en funcionament la tècnica dinàmica de mesures de OUR. S'inicialitzen les variables relacionades amb aquest, es capten les dades d'oxigen dissolt entre els límits per al càlcul de la OUR (50% i 30% de saturació) amb les quals es resolen les variables de l'Equació 5.1 per, finalment, realitzar-ne el càlcul pròpiament dit i emmagatzemar el valor. A partir d'aquest instant, el cultiu recupera les consignes de control normal i la recepta s'atura fins que s'exhaureix l'interval de temps de 3 h, moment on comencen les operacions prèvies a la repetició del protocol de OUR. S'inicialitzen novament les variables, i s'augmenta la consigna d'oxigen dissolt fins al 60% perquè totes les pertorbacions davallin des del mateix punt de saturació.

Si es vol donar per finalitzada l'operació, només cal que l'usuari modifiqui el valor de la transició “Iterar” a NO, i s'accedeixi a la fase de control final.

- Operació “Final Procés”: en aquesta se situen les fases que aturen tots els controls i l'emmagatzematge de les variables que s'utilitzen a la recepta.

Cal esmentar que en el diagrama de flux no s'observa cap diferència entre les etapes de creixement del cultiu i d'infecció, ja que les actuacions necessàries per iniciar la infecció no afecten en absolut el comportament de la recepta, on les condicions de cultiu continuen essent les mateixes i la OUR no s'atura.

5.4.2.2. Caracterització de la producció en discontinu

Els resultat del cultiu obtingut amb el sistema convencional de producció operant en discontinu sense infecció, el qual serveix de referència per descriure el comportament de la línia cel·lular, es presenta a la Figura 5.11. Aquest es realitza en medi 293 SFMII, suplementat amb 4 mM de glutamina (Invitrogen Corporation) i 50 ppm d'antiescumejant C (Sigma Aldrich).

El cultiu es desenvolupa sota les següents consignes de les principals variables de control: temperatura de 37 °C, oxigen dissolt de 50%, pH de 7,1 unitats i agitació de 75 rpm.

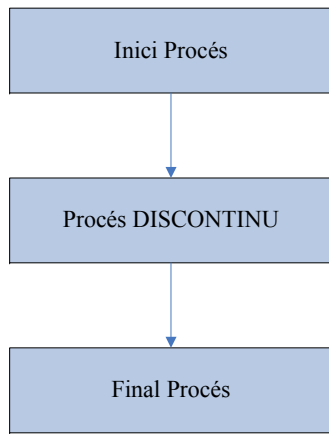
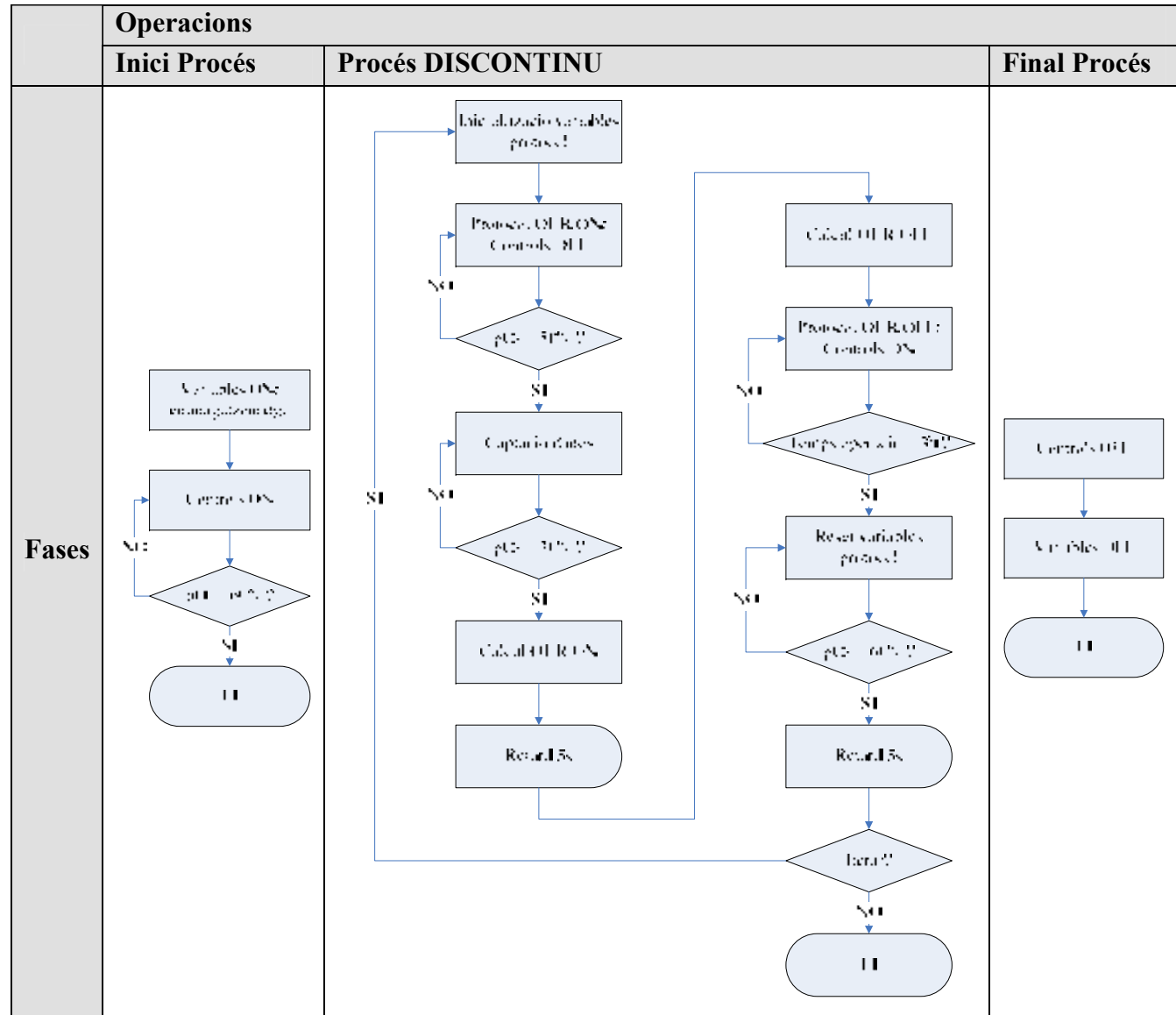


Figura 5.10. Diagrama d'operacions que componen la recepta BATCH per a l'operació en discontinu.



Taula 5.4. Diagrama de flux de les fases/transicions que integren cadascuna de les operacions de la recepta BATCH.

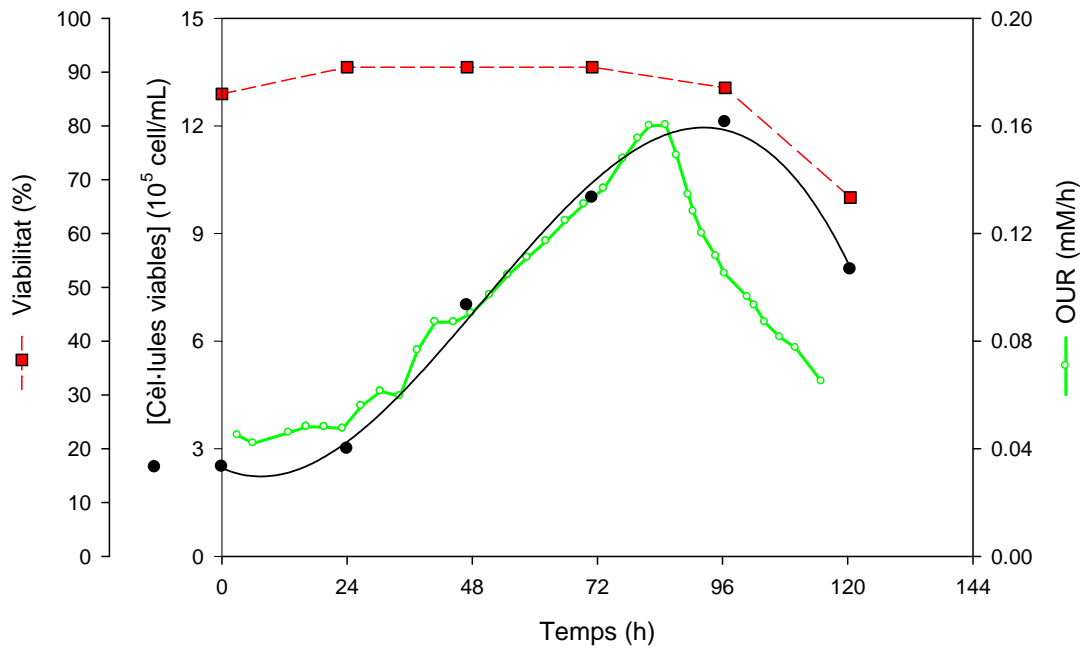


Figura 5.11. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de OUR (—) i de viabilitat cel·lular (■) en un cultiu en discontinu en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

La inoculació es realitza a una concentració de $2,5 \cdot 10^5$ cell/mL, amb cèl·lules provinents d'un procés d'escalat previ, les quals es troben a la meitat de la fase de creixement exponencial. Com es pot observar a l'inici, la densitat cel·lular indica una fase de latència durant les primeres 24 h, aquest període s'interpreta com un període d'adaptació a les noves condicions en el bioreactor. A continuació, el creixement evoluciona de forma exponencial fins a una concentració màxima de $12,1 \cdot 10^5$ cell/mL en aproximadament 96 h. A partir d'aquest instant, tant la concentració de cèl·lules com la seva viabilitat, la qual s'havia mantingut lleugerament per sobre del 90%, decreixen durant la característica fase de mort cel·lular.

En referència al perfil de OUR, aquest es comporta de manera anàloga al creixement cel·lular, tal i com es descriu a l'apartat 5.1.1. El menor nombre de cèl·lules durant les primeres 24 h obliga a realitzar determinacions cada 3 h amb l'objectiu de pertorbar el menys possible el cultiu; no obstant, en vista de l'augment dels valors de OUR un cop superada la fase de latència, la freqüència de mesura s'incrementa a 2 h. El seu valor inicial de 0,045 mM/h augmenta paulatinament fins a un màxim de 0,16 mM/h a les 85 h, moment a partir del qual cau continuadament fins al final del cultiu. Per tant, existeix una diferència de 11 h entre els màxims de les dues corbes descrites. La OUR, en ésser una mesura de l'activitat cel·lular, detecta de forma anticipada els canvis fisiològics que pateix el cultiu, tot anticipant-se al recompte cel·lular fora de línia.

El comportament del cultiu descrit fins al moment també es pot relacionar directament amb l'evolució dels principals metabòlits analitzats. A la Figura 5.12 es mostra la tendència de la glucosa, com a font de carboni més important, i del lactat, com a principal subproducte metabòlic.

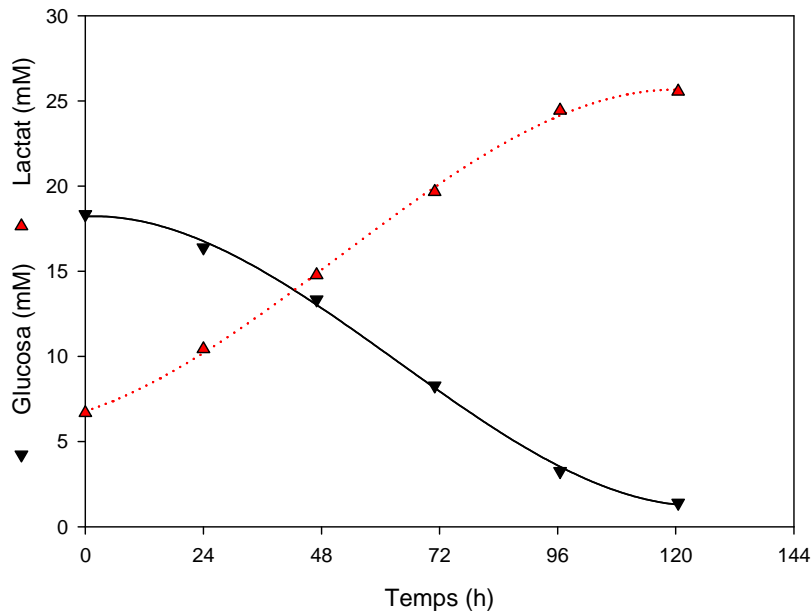


Figura 5.12. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en discontinu en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

Pel que fa a la variació de la glucosa, el medi inoculat conté una concentració de 18,3 mM, la qual decreix fins a un valor de 1,4 mM al final del cultiu; com a conseqüència, es pot afirmar que l'aturada en l'activitat del cultiu a les 85 h no és causada per l'esgotament d'aquesta font de carboni. Per la seva banda, el lactat, metabòlit procedent de l'oxidació incompleta del piruvat a través de la via catabòlica de la glicòlisi, inicia el cultiu amb una concentració de 6,7 mM i, finalment, assoleix un valor de 25,6 mM. Aquest és sovint el causant de la majoria d'inhibicions en cultius cel·lulars, ja que acidifica el medi; de manera que, per mantenir el pH controlat, el cultiu requereix l'addició de compostos bàsics correctors del pH, en aquest cas NaHCO_3 . Aquesta addició provoca un augment de l'osmolaritat del medi que afecta negativament el creixement cel·lular [58, 59]. Tal i com es comenta al capítol anterior, estudis previs indiquen que concentracions de lactat per sobre 20 mM comencen a tenir un efecte inhibitori sobre el creixement de la cèl·lula [60]; per tant, a partir de les 72 h, el cultiu ja es troba en rang que podria ésser inhibitori.

Cal comentar que les concentracions inicials dels dos metabòlits es troben lluny dels valors del medi fresc (aproximadament 25 mM, per a la glucosa i 0 mM, per al lactat), ja que les cèl·lules es van inocular al bioreactor sense centrifugació prèvia, per evitar una possible reducció en la seva viabilitat. Aquest fet pot haver perjudicat negativament el cultiu, tot reduint el seu marge de creixement i generant la fase de latència observada. No obstant, això no afectarà negativament el valor de la concentració d'infecció que se n'extregui d'aquest experiment, ja que si existís un creixement cel·lular superior en medi fresc, a la concentració d'infecció determinada en aquest cultiu, les cèl·lules es trobaran encara més actives en la fase de creixement exponencial.

Tanmateix, cal esmentar que l'abrupta caiguda de la OUR observada a la Figura 5.11 podria també indicar altres nutrients limitants o inhibidors del cultiu. En general, la complexa formulació dels medis de cultiu cel·lular i, en particular, el desconeixement de la composició del medi 293 SFMII requereixen d'un treball molt laboriós per determinar quins podrien ser.

D'acord amb treballs anteriors del grup de recerca, la glutamina i l'amoni podrien tenir un paper molt destacat [34, 61]. D'una banda, la glutamina actua com a font principal de nitrogen, així com a font complementària de carboni. Aquest metabòlit segueix un procés d'oxidació anomenat glutaminòlisi, durant el qual es contribueix a la formació de precursors dels principals constituents cel·lulars (aminoàcids, proteïnes, nucleòtids i lípids) i s'obté fonamentalment amoni, com a principal subproducte. La glutaminòlisi finalitza en la formació de α -cetoglutarat, el qual s'incorpora al cicle dels àcids tricarbòxílics (TCA o cicle de Krebs) d'on s'obté energia i piruvat. A través de la seva oxidació parcial pot acabar produint, a la seva vegada, lactat. Per tant, la presència en excés de glutamina pot potencialment conduir cap a la producció a nivells inhibitoris de lactat i amoni [62]. Per aquesta raó, la glutamina és suplementada a baixes concentracions en el medi de cultiu (4 mM) i pot representar el substrat limitant, exhaurit a les 85 h de cultiu a la Figura 5.11.

D'altra banda, l'amoni redueix el pH intracel·lular, la qual cosa es relaciona amb una pèrdua d'eficiència metabòlica degut al fet que la cèl·lula es veu obligada a secretar-lo [63]. Hassell i col. han publicat que no existeix inhibició en el creixement de la cèl·lula fins a concentracions 2,5 mM [60].

5.4.2.2.1. Cultiu amb infecció

Com s'ha discutit a l'apartat 5.2.1, entre les múltiples alternatives en discontinu per infectar el cultiu es decideix escollir aquella més senzilla i fàcilment escalable. De manera que, la infecció es realitzarà sense cap tipus de recanvi de medi exhaurit, ni parcial ni total, només amb la introducció de l'inòcul víric amb 200 mL de medi fresc. Tot esperant una bona infectivitat, es determina la concentració de cèl·lules viables per iniciar la infecció, a partir de l'anterior experiment, en $10 \cdot 10^5$ cell/mL, ja que a aquesta concentració encara no s'observen limitacions de cap tipus en el cultiu (veure Figura 5.11 i Figura 5.12).

El cultiu amb infecció s'inicia centrifugant les cèl·lules abans d'inocular-les en el bioreactor, tot i que cal tenir present que aquesta pràctica tindrà limitacions a l'hora d'augmentar l'escala de producció. A la Figura 5.13 es mostra el resultat obtingut amb el sistema convencional de producció operant en discontinu amb infecció. Aquest experiment es realitza en idèntiques condicions a les descrites per a la producció sense infecció, tant a nivell de medi de cultiu com de les variables controlades al bioreactor.

Per facilitar la comprensió, les dues fases del procés de producció de vectors adenovirals (la fase de creixement cel·lular i la fase d'infecció) s'indiquen a la mateixa figura.

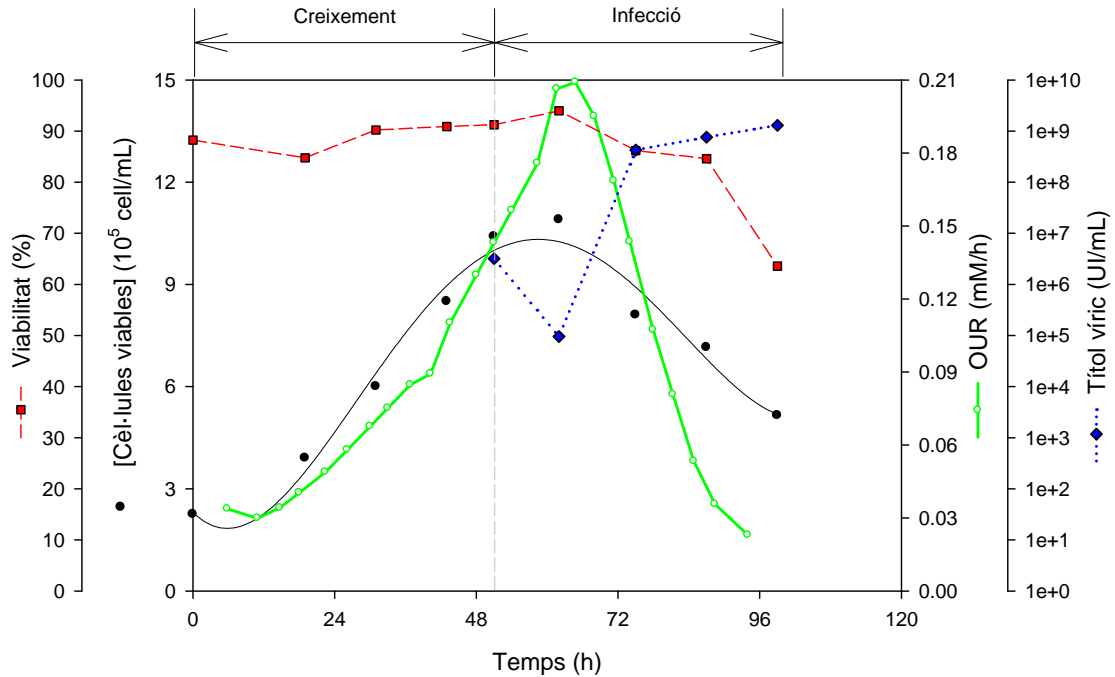


Figura 5.13. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de OUR (—), de viabilitat cel·lular (■) i de títol víric (◆) en un cultiu en discontinu amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

La fase de creixement es perllonga durant 51 h. Al llarg d'aquesta, el perfil és molt similar a l'obtingut al cultiu de referència, encara que sense la presència del període de latència observat a la Figura 5.11. La concentració de cèl·lules viables augmenta des d'una densitat d'inòcul de $2,3 \cdot 10^5$ cell/mL, fins a la densitat d'infecció de $10 \cdot 10^5$ cell/mL, tot mantenint-se la viabilitat cel·lular aproximadament constant, per sobre del 90%. El perfil en línia de OUR segueix de forma paral·lela el creixement del cultiu sense cap mena de perturbació.

D'acord amb els paràmetres d'infecció fixats en l'anterior capítol del present treball, la inoculació vírica s'inicia amb la MOI teòrica de 5 UI/cell, per assegurar l'aprofitament de l'excés de partícules durant el començament de la infecció, i la fase d'infecció s'allarga el temps de recollida (TOH) de 48 h postinfecció; això es tradueix en un temps final de l'experiment de 99 h. Un cop infectat el cultiu, la seva velocitat de creixement decau, i les cèl·lules assoleixen un màxim de concentració de $11 \cdot 10^5$ cell/mL a les 12 h postinfecció (63 h de cultiu). Aquest lleuger repunt es relaciona amb el cicle infectiu de l'adenovirus: a partir de les 9 h postinfecció, comença a produir-se el DNA adenoviral, per tant, les cèl·lules que es trobin en la fase S del cicle cel·lular finalitzaran la seva duplicació abans d'ésser infectades [64, 65]. Amb l'avanç del cicle infectiu, la concentració de cèl·lules decau, així com la seva viabilitat, arribant a valors finals de $5,2 \cdot 10^5$ cell/mL i 63%, respectivament, en el temps de recollida. El perfil de OUR indica que l'activitat cel·lular augmenta i s'estabilitza a les 14 h postinfecció durant un curt període de temps, assolint un màxim de 0,21 mM/h, per posteriorment decreixer fins al final del cultiu. De manera que, les cèl·lules romanen actives, com a mínim, un 30% del cicle infectiu.

Un aspecte important que cal també destacar de la Figura 5.13 és el comportament de la corba de titulació vírica representada en escala semilogarítmica, ja descrit en el capítol anterior. Aquesta comença amb un inòcul víric de $32 \cdot 10^5$ UI/mL, per posteriorment patir una davallada fins a les 12 h postinfecció, deguda a l'etapa del cicle de replicació adenoviral on els virions perden la seva estructura per infectar les cèl·lules. A partir d'aquest moment, la corba es recupera arribant a un valor de títol víric de $1,3 \cdot 10^9$ UI/mL en el TOH.

A banda del títol víric final, un dels paràmetres àmpliament emprat i que descriu millor la producció de vectors adenovirals és la productivitat específica cel·lular, la qual es calcula segons l'expressió:

$$P_{\text{específica}} = \frac{[\text{Títol víric}]_{\text{final}}}{X_{v,\text{inf}}}$$

Equació 5.5. Càlcul de la productivitat específica cel·lular ($P_{\text{específica}}$), on: $[\text{Títol víric}]_{\text{final}}$ és el títol víric en el temps de recollida, $X_{v,\text{inf}}$ és la concentració de cèl·lules viables en el moment d'infecció.

S'utilitza la concentració cel·lular viable en el moment d'infecció, ja que són les cèl·lules que entren en contacte inicialment amb l'adenovirus, i a partir de les quals es realitzarà l'amplificació d'aquest últim. Considerant que la densitat cel·lular en el moment d'infecció és de $10 \cdot 10^5$ cell/mL, s'obté una productivitat específica cel·lular de 1.300 UI/cell per a la infecció en discontinu amb sistema convencional. La resta de paràmetres d'infecció resultants del cultiu es recullen a la Taula 5.5.

Paràmetres d'infecció	
$X_{v,\text{inf}}$ (10^6 cell/mL)	1
MOI teòrica / real (UI/cell)	5 / 3
TOH (h postinfecció)	48
$[\text{Títol víric}]_0$ (10^6 UI/mL)	3,2
$[\text{Títol víric}]_{\text{final}}$ (10^9 UI/mL)	1,3
$P_{\text{específica}}$ (UI/cell)	1.300

Taula 5.5. Paràmetres d'infecció en el sistema convencional operant en discontinu.

D'acord amb el recull de dades de producció publicat per Nadeau i col. [2], els paràmetres d'infecció obtinguts es poden considerar dins del rang establert per a cultius en discontinu de cèl·lules HEK293S. Malgrat tot, els resultats bibliogràfics provenen de produccions en discontinu seqüencial, és a dir, amb recanvi de medi de cultiu total. De manera que, la productivitat específica, tal i com era d'esperar, resulta entre 1 i 4 vegades millor que l'aconseguida en aquest experiment [66].

De forma anàloga a la Figura 5.12 del cultiu previ, a la Figura 5.14 es mostren els perfils de glucosa i lactat al llarg del cultiu amb infecció.

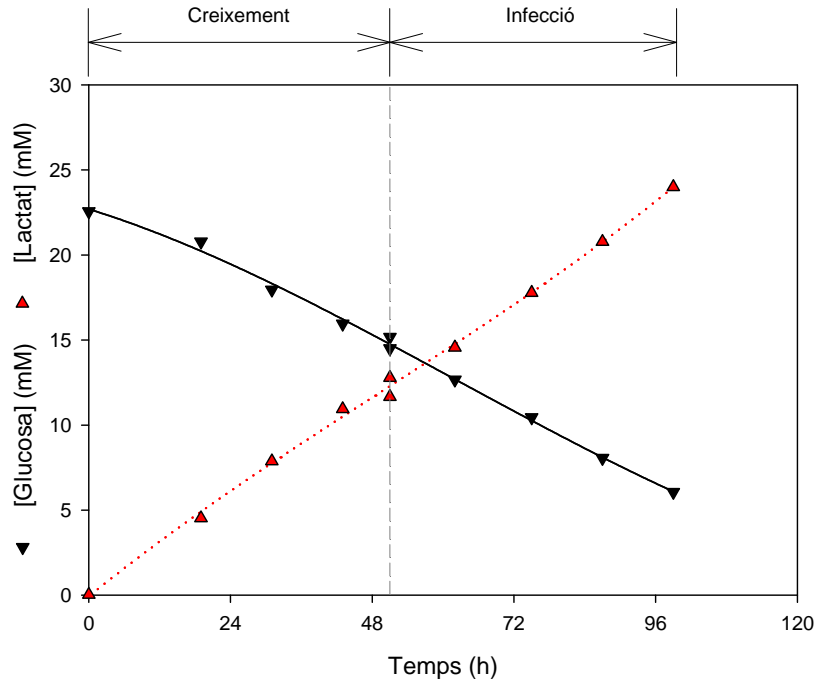


Figura 5.14. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en discontinu amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

La figura anterior confirma, allò que el perfil de OUR de la Figura 5.13 ja indicava, és a dir, que en el moment d'infecció no existeix cap limitació per la concentració de glucosa al medi de cultiu, ni inhibició per la de lactat. La glucosa comença la fase de creixement amb una concentració de 22 mM i la finalitza amb 14,5 mM; en canvi, la concentració de lactat presenta una concentració inicial de 0,03 mM, pràcticament nul·la degut al procés de centrifugació i resuspensió de l'inòcul en medi fresc i assoleix un valor de 12,8 mM a les 51 h, moment d'infecció.

A l'inici de la fase d'infecció es donen perturbacions quasi inapreciables en les dues variables per l'addició dels 200 mL de medi fresc amb l'inòcul adenoviral. Durant aquesta fase, tot i la caiguda de la concentració i la viabilitat cel·lulars, el consum de glucosa i la producció de lactat mantenen les tendències observades durant el creixement cel·lular. Així, s'arriba a una concentració final de glucosa de 6 mM i de lactat de 24 mM. Tot i que la concentració final de glucosa en el cultiu infectat és superior a l'obtinguda en la Figura 5.12 (1,4 mM), cal considerar que en el cultiu amb infecció es parteix d'una concentració superior i que no s'observa cap fase de latència, on hi ha consum de nutrients i manca de creixement cel·lular.

Després dels dos primers experiments portats a terme fins al moment amb el sistema convencional operant en discontinu, es planteja la necessitat de realitzar una anàlisi dels paràmetres cinètics i estequiomètrics a partir de les dades adquirides, per tal de comparar quantitativament el seu comportament.

5.4.2.3. Determinació dels paràmetres cinètics i estequiomètrics.

Els paràmetres cinètics, com la velocitat específica de creixement, aquells relacionats amb els metabòlits analitzats (substrats i/o productes) o els rendiments estequiomètrics dels mateixos, condensen tota la informació que s'extreu dels experiments, ja sigui amb dades en línia o fora de línia, i permeten realitzar una discussió i comparació objectiva dels resultats. La utilització d'algunes d'aquestes variables permet tant caracteritzar la cinètica del creixement cel·lular com identificar l'estat fisiològic del cultiu. A més, alguns d'aquests indicadors poden facilitar el desenvolupament de criteris per controlar l'addició dinàmica de nutrients, tal i com es veurà més endavant en l'estratègia en continu amb perfusió [34].

Per determinar qualsevol dels paràmetres mencionats anteriorment, es parteix de les equacions dels balanços de matèria en discontinu per a cadascun dels components que integren el sistema (cèl·lules, substrats i productes):

$$V_R \cdot \frac{dX_V}{dt} = (\mu - \mu_d) X_V \cdot V_R$$

Equació 5.6. Balanç de matèria aplicat a les cèl·lules viables per a un bioreactor de tanc agitat operant en discontinu, on: X_V és la concentració de cèl·lules viables, t és el temps, V_R és el volum del reactor, μ és la velocitat específica de creixement, μ_d és la velocitat específica de mort.

$$V_R \cdot \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X_V \cdot V_R$$

Equació 5.7. Balanç de matèria aplicat al substrat per a un bioreactor de tanc agitat operant en discontinu, on: S és la concentració de substrat, q_s és la velocitat específica de consum del substrat, X_V és la concentració de cèl·lules viables, t és el temps, V_R és el volum del reactor.

$$V_R \cdot \frac{dP}{dt} = q_p \cdot X_V \cdot V_R$$

Equació 5.8. Balanç de matèria aplicat al producte per a un bioreactor de tanc agitat operant en discontinu, on: P és la concentració de producte, q_p és la velocitat específica d'obtenció del producte, X_V és la concentració de cèl·lules viables, t és el temps, V_R és el volum del reactor.

A continuació es descriu el tractament matemàtic de cadascuna de les tres equacions anteriors per obtenir-ne els paràmetres esmentats:

- Per calcular la velocitat específica de creixement màxima, s'integra l'Equació 5.6, i s'aplica a la zona de creixement exponencial entre els límits inicials ($t_0, X_{V,0}$) i els finals (t, X_V), on es pot menysprear el terme de mort (μ_d). Només en aquest interval, la velocitat passa a ser constant i màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$), i es pot escriure l'Equació 5.9.

$$\ln(X_V) = \ln(X_{V,0}) + \mu_{m\grave{a}x} (t - t_0)$$

Equació 5.9. Solució del balanç de matèria aplicat a les cèl·lules viables per a un bioreactor de tanc agitat operant en discontinu, on: X_V és la concentració de cèl·lules viables, $X_{V,0}$ és la concentració de cèl·lules viables inicial, $\mu_{m\grave{a}x}$ és la velocitat específica de creixement màxima, t és el temps, t_0 és el temps inicial.

La representació gràfica de les dades logarítmiques de la concentració de cèl·lules viables ($\ln(X_V)$) respecte el temps correspon a una línia recta amb pendent igual a la velocitat específica de creixement màxima (μ_{\max}).

- A partir de l'Equació 5.9, es pot determinar el temps de duplicació, definit com aquell instant on la proliferació cel·lular dobla el seu valor previ. Senzillament substituint en aquesta $X_V = 2 \cdot X_{V,0}$ i $t = t_{\text{dupl}}$, s'obté la següent expressió:

$$t_{\text{dupl}} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

Equació 5.10. Expressió per al càlcul del temps de duplicació (t_{dupl}), on: μ_{\max} és la velocitat específica de creixement màxima.

- Per fer l'estimació dels paràmetres específics de consum o producció de metabòlits al llarg del cultiu, utilitzant el nombre de dades (n) obtingudes fora de línia, és necessari un tractament més complex que els anteriors. Es comença per discretitzar les equacions dels balanços (veure Equació 5.7 i Equació 5.8) i per expressar-les en forma d'incrementos acumulats, tal i com es pot observar a continuació:

$$\text{a) } \sum_n \Delta S = -q_S \cdot \sum_n [X_V \cdot \Delta t] \quad ; \quad \text{b) } \sum_n \Delta P = q_P \cdot \sum_n [X_V \cdot \Delta t]$$

Equació 5.11. Balanços de matèria discretitzats aplicats a un bioreactor de tanc agitat operant en discontinu: a) substrat; b) producte.

De les expressions anteriors es dedueix que la determinació de les velocitats específiques (q_S i q_P) consisteix en representar els termes de consum de substrat acumulat ($\sum \Delta S$) o d'obtenció de producte acumulada ($\sum \Delta P$) respecte el terme $\sum [X_V \cdot \Delta t]$ i obtenir el pendent d'aquesta representació [67].

La determinació dels paràmetres acumulats ($\sum \Delta S$ i $\sum \Delta P$) es realitza a partir d'un balanç de matèria i de les mostres analitzades fora de línia, les quals conformen els perfils de metabòlits descrits a la Figura 5.12 i la Figura 5.14. Per tant, aquest càlcul depèn del tipus d'estratègia amb la qual s'operi. En concret, per a la producció en discontinu, els valors dels paràmetres acumulats s'expressen com:

$$\text{a) } \sum_{i=1}^{n-1} \Delta S_i = \sum_{i=1}^{n-1} (S_{i-1} - S_i) \quad ; \quad \text{b) } \sum_{i=1}^{n-1} \Delta P_i = \sum_{i=1}^{n-1} (P_i - P_{i-1})$$

Equació 5.12. Expressions per calcular els paràmetres acumulats en discontinu: a) substrat; b) producte.

L'Equació 5.12a és aplicable al càlcul del consum acumulat dels substrats analitzats fora de línia, en el present treball només la glucosa (GC). De manera anàloga, l'Equació 5.12b és aplicable en el cas del lactat, per a la seva producció acumulada (LP). En canvi, en el cas de l'oxigen, substrat que disposa de mesures en línia del seu consum al llarg del cultiu, mitjançant la mesura de la OUR, la velocitat específica de consum d'oxigen també es pot definir com:

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{X_V}$$

Equació 5.13. Definició de la velocitat específica de consum d'oxigen (q_{O_2}) en funció de la OUR i la concentració de cèl·lules viables (X_V).

Tal i com fan Zhou i col., per determinar el consum d'oxigen acumulat (OC) es pren l'Equació 5.13 i es substitueix a l'Equació 5.7 aplicada a l'oxigen, per arribar a la següent expressió discretitzada [39]:

$$OC = \sum_{i=1}^{n-1} (\Delta C_{O_2})_i = \sum_{i=1}^{n-1} [\overline{OUR}_i \cdot (t_i - t_{i-1})] ; \overline{OUR}_i = \frac{OUR_i + OUR_{i-1}}{2}$$

Equació 5.14. Expressions per determinar el consum d'oxigen acumulat (OC), on: \overline{OUR}_i és la mitjana de OUR a l'interval de temps (t_i, t_{i-1}).

Finalment, manca per avaluar el terme $\sum [X_V \cdot \Delta t]$. Aquest es denomina integral de cèl·lules viables (ICV), és independent de l'estratègia de producció i es calcula, segons publiquen Bibila i col. [68], com:

$$ICV = \int_0^t X_V dt = \sum_{i=1}^{n-1} [\bar{X}_{V,i} \cdot (t_i - t_{i-1})] ; \bar{X}_{V,i} = \frac{X_{V,i} + X_{V,i-1}}{2}$$

Equació 5.15. Expressions per calcular la integral de cèl·lules viables (ICV), on: $\bar{X}_{V,i}$ és la mitjana de cèl·lules viables a l'interval de temps (t_i, t_{i-1}).

- Les relacions estequiomètriques entre metabòlits, conegudes com a rendiments (normalment de caràcter producte/substrat) es calculen senzillament a partir de la següent expressió:

$$Y_{A/B} = \frac{q_A}{q_B}$$

Equació 5.16. Expressió per al càlcul del rendiment ($Y_{A/B}$), on: q_A és la velocitat específica del component A, q_B és la velocitat específica del component B.

Tots els paràmetres calculats per als dos cultius que integren la producció en discontinu es recullen a la Taula 5.6, juntament amb algunes dades útils per a la comparació.

A la vista dels valors obtinguts, els paràmetres de la fase de creixement dels dos cultius són molt similars. Així, els valors de la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$) i de temps de duplicació (t_{dupl}) es troben dins del rang típic de les línies cel·lulars productores d'adenovirus (entre 24 h i 30 h) [3], pròxims als valors de treballs publicats amb la línia cel·lular HEK293S [49, 69] i el mateix medi de cultiu [62]. De manera similar succeeix amb la resta de velocitats específiques (q_{Gluc} , q_{Lac} , q_{O_2}) i de rendiments ($Y_{Lac/Gluc}$, $Y_{O_2/Gluc}$) [49, 70].

Paràmetre cinètic	Producció en discontinu		
	Referència	Infecció	
	Creixement	Creixement	Infecció
μ_{\max} (h^{-1})	0,0255	0,0305	-
t_{dupl} (h)	27	23	-
q_{Gluc} ($\text{nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$)	220	210	270
q_{Lac} ($\text{nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$)	290	300	380
q_{O_2} ($\text{nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$)	130	120	160
$Y_{\text{Lac}/\text{Gluc}}$ (mmol/mmol)	1,32	1,42	1,41
$Y_{\text{O}_2/\text{Gluc}}$ (mmol/mmol)	0,59	0,57	0,59
$X_{v,\max}^*$ ($10^6 \text{ cell}/\text{mL}$)	1,2	-	1,1
OUR_{\max}^* (mM/h)	0,16	-	0,21

Taula 5.6. Paràmetres cinètics en el sistema convencional operant en discontinu. *El valor màxim s'informa a la fase on es dona.

El fet més destacable de la Taula 5.6 és l'augment en la fase d'infecció de totes les velocitats específiques calculades en aproximadament un 30% respecte el mateix valor en la fase de creixement. Es troba àmpliament reportat a la bibliografia que durant la infecció, la cèl·lula requereix de més energia per sintetitzar les proteïnes adenovirals i, fins i tot, per augmentar de volum i massa per donar cabuda als nous virions [2, 43, 48, 51, 55, 69, 71]. Aquest fenomen també es veu reflectit en el valor màxim de la OUR del cultiu infectat, major respecte al del cultiu sense infecció, tot i que la densitat cel·lular màxima és inferior.

5.4.3. Producció en continu amb perfusió

5.4.3.1. Descripció de la producció en continu amb perfusió

La major complexitat operacional d'aquesta estratègia obliga a afegir nous elements al bioreactor i a l'ordinador de gestió, per tal de completar el muntatge experimental (veure Figura 5.15 i esquema de la Figura 5.16): un nou sistema d'aeració, el sistema de retenció cel·lular i el sistema d'addició de nutrients.



Figura 5.15. Sistema convencional (bioreactor Biostat Bplus): muntatge experimental operant en continu amb perfusió.

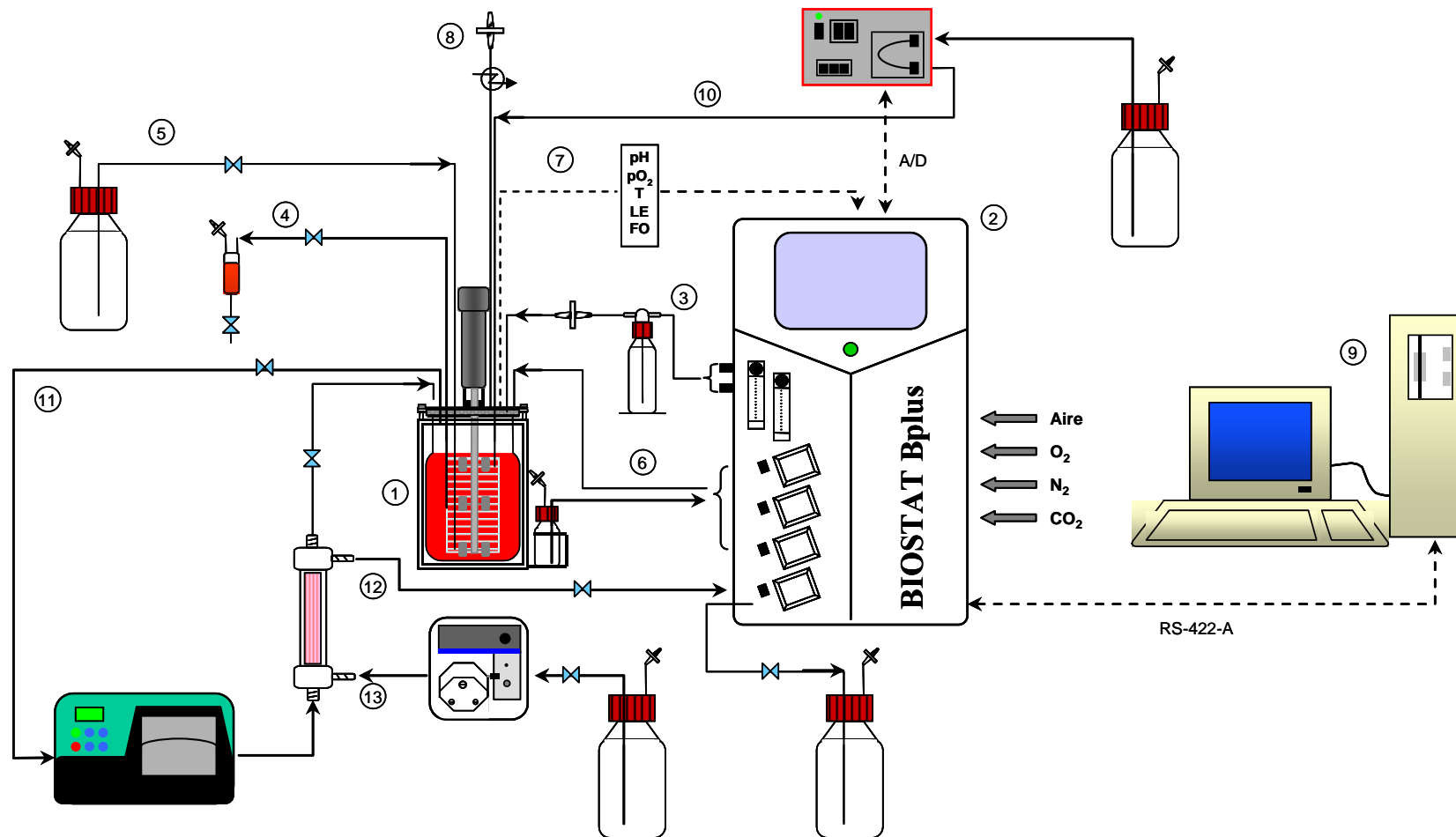


Figura 5.16. Sistema convencional: esquema del muntatge experimental operant en continu amb perfusió. 1) Cuba del bioreactor (2 L); 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos; 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 4) Presa de mostra manual; 5) Circuit d'inoculació; 6) Circuit d'addició d'àcid, de base i d'antiescumejant; 7) Sondes de temperatura, pH, pO_2 , de detecció d'escumes i nivell; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Ordinador de gestió i control; 10) Circuit d'addició de nutrients; 11) Circuit de recirculació; 12) Circuit d'eliminació de medi exhaurit; 13) Circuit de retroneteja del mòdul de perfusió.

Pel que fa al sistema d'aeració, a l'inici del cultiu en perfusió sempre és recomanable continuar treballant amb la membrana tubular de silicona per assegurar un bon creixement cel·lular amb el mínim estrès. Tanmateix, el previsible augment de la concentració cel·lular fa necessària la utilització d'un dispositiu addicional amb dinàmica més ràpida: el difusor de bombolles (*sparger*).

El principal inconvenient d'aquest tipus d'aeració és el considerable augment en la formació d'escumes, i l'estrès cel·lular que provoca el trencament de les bombolles formades a la superfície del fluid. Per minimitzar aquest problema, s'estableixen límits en el cabal d'aeració i en l'agitació del bioreactor, entre 0,1 vvm i 0,2 vvm (entre 200 mL/min i 400 mL/min de cabal de gas per volum de bioreactor de 2 L) [34, 72] i 120 rpm respectivament. També és possible addicionar components com el polímer Pluronic F-68, el qual ja es troba en la formulació del medi 293 SFMII, i agents antiescumejants, com el antifoam C.

A l'hora de definir l'element de retenció, existeixen dues alternatives principals comunament emprades en processos de producció adenoviral, cadascuna d'elles amb els seus avantatges i inconvenients propis: els dispositius basats en la separació per ultrasons (separadors acústics) i els basats en la separació per filtració. La primera, relativament més moderna i cara, ofereix una eficiència de separació d'entre el 90% i el 99%. La seva aplicació no provoca cap efecte negatiu sobre les cèl·lules, de manera que es redueix considerablement l'estrès que pot portar a la pèrdua de viabilitat cel·lular deguda a processos de lisi, ja que la membrana cel·lular esdevé més sensible durant la infecció [55].

En canvi, com s'ha comentat a l'apartat 5.2.3.1, la utilització de mòduls de filtració està àmpliament estesa, degut al seu relativament baix cost, senzillesa d'operació i fàcil adaptació a qualsevol bioreactor. Entre les possibles configuracions de filtres es distingeixen aquelles que es munten a l'interior de la cuba de bioreacció, com els filtres giratoris (*spin filters*) [73, 74], i les que ho fan a l'exterior, com els filtres de fibres buides (*hollow fibers*) [52, 56]. Ambdós tipus es distingeixen principalment pel grau de robustesa que proporcionen al procés, en detriment del grau d'accessibilitat si és dona qualsevol problema operacional, un cop iniciat el procés. Així, mentre la configuració interna permet estalviar la presència d'un circuit de recirculació extern on el brou de cultiu és bombat a través de l'element de filtració, a la seva vegada, el fenomen d'obturació del filtre obligaria a aturar immediatament el procés de producció, sigui quin sigui el seu estat, i reiniciar-ne un de nou amb el consegüent cost econòmic.

Degut a l'ampli coneixement previ del que disposa el grup de recerca [34], s'opta pel filtre de fibres buides extern CellFlo (Spectrum Laboratories) com a sistema de retenció cel·lular. Aquest disposa de 620 cm² d'àrea i un diàmetre de porus de 0,2 µm (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.5.1.4 del capítol de materials i mètodes). A més, considerant la importància d'aquest element, s'afegeix una segona unitat de més àrea (1.200 cm²), per tal de donar més seguretat i robustesa al procés, com es mostra a la Figura 5.17.



Figura 5.17. Detall del muntatge experimental operant en continu amb perfusió: conjunt de filtres de fibres buides doblat.

Com a conseqüència de la instal·lació dels *hollow fibers*, cal tenir molt en compte el possible efecte negatiu sobre el creixement que patirà el cultiu degut al continu bombament a través del circuit de recirculació extern. Per tant, la sensibilitat de la línia cel·lular a l'estrès tallant (*shear stress*) és un factor que caldrà determinar en cada experiment i mantenir-lo per sota de límits no perjudicials per a les cèl·lules actuant sobre el cabal de recirculació de la bomba. D'aquesta manera, si s'aplica un balanç de moviment en un cilindre s'obté l'Equació 5.17 per determinar la velocitat de cisallament (*shear rate*), a partir de les característiques del filtre i del cabal de recirculació.

$$\gamma = \frac{4 \cdot Q_{fb}}{\pi \cdot r_{fb}^3} = \frac{32 \cdot Q_{recirc}}{\pi \cdot D_{fb}^3 \cdot N}$$

Equació 5.17. Expressió del balanç de moviment per al flux laminar a través del filtre de fibres buides, on: γ és la velocitat de cisallament, Q_{fb} és el cabal de recirculació a través d'una fibra, r_{fb} és el radi intern d'una fibra, Q_{recirc} és el cabal de recirculació, D_{fb} és el diàmetre intern d'una fibra, N és el nombre de fibres del filtre.

Segons les dades publicades per Zhang i col. i Maoirella i col., és aconsellable evitar que γ superi 1300 s^{-1} o els 3000 s^{-1} respectivament, valors a partir dels quals la viabilitat cel·lular es veuria seriosament afectada [75, 76].

Un altre factor també molt útil és la determinació del temps de residència a l'interior del filtre, el qual es calcula a partir de l'Equació 5.18.

$$\tau_{HF} = \frac{V_{HF}}{Q_{recirc}} = \frac{N \cdot \pi \cdot D_{fb}^2 \cdot L_{fb}}{4 \cdot Q_{recirc}}$$

Equació 5.18. Expressió per al càlcul del temps de residència al filtre de fibres buides (τ_{HF}), on: V_{HF} és el volum intern de les fibres del filtre, Q_{recirc} és el cabal de recirculació, D_{fb} és el diàmetre intern d'una fibra, N és el nombre de fibres del filtre, L_{fb} és la longitud d'una fibra.

Finalment, l'addició de nutrients es basa en una bomba peristàltica que controla de forma acurada el cabal de medi fresc. L'aspecte més important d'aquest sistema és l'establiment del protocol d'addició. Aquest es basa en el control del cabal (o la velocitat) de perfusió per mantenir en el bioreactor un nivell residual de glucosa, fora de tota limitació, i que obligui la cèl·lula a realitzar un ús més eficient de la resta de nutrients i, en conseqüència, una menor subproducció de components inhibitoris com el lactat o l'amoni [49, 62, 70]. En base als experiments previs, on no s'ha detectat la manca de limitació en el creixement, aquesta concentració residual es fixa en 5 mM de glucosa.

L'estimació del cabal de perfusió es realitza en base al treball publicat per Seamans i Hu (veure Equació 5.19), de forma automatitzada, i aprofitant l'evolució de la mesura en línia de la OUR, juntament amb el programari de control avançat que disposa el sistema de cultiu convencional [77]. El reajust del cabal s'efectua d'una forma molt més freqüent que en la majoria dels protocols d'addició publicats, on el cabal de perfusió es manté constant o s'ajusta diàriament [52, 55, 56].

$$Q_{add,i+1} = Vel_{perf,i+1} \cdot V_R = \frac{q_{Gluc} \cdot X_{OUR,i} \cdot \exp(\mu_{OUR,i} \cdot \Delta t_{i+1})}{Gluc_F - Gluc_{sp}} \cdot V_R$$

Equació 5.19. Expressió per al càlcul del cabal de perfusió al pròxim interval de temps ($Q_{add,i+1}$), on: $Vel_{perf,i+1}$ és la velocitat de perfusió durant el temps següent, V_R és el volum del bioreactor; q_{Gluc} és la velocitat específica de consum de glucosa, $X_{OUR,i}$ és la concentració cel·lular en línia estimada a partir de la OUR, $\mu_{OUR,i}$ és la velocitat específica de creixement en línia estimada a partir de la OUR, $Gluc_F$ és la concentració de glucosa en el medi d'alimentació, $Gluc_{sp}$ és la concentració residual de glucosa al bioreactor.

En l'expressió anterior, el terme $X_{OUR,i} \cdot \exp(\mu_{OUR,i} \cdot \Delta t_{i+1})$ correspon a la projecció de la concentració cel·lular en el pròxim interval de temps (Δt_{i+1}). El càlcul es realitza suposant que el cultiu continuarà creixent amb la mateixa velocitat específica.

Per calcular la concentració cel·lular en línia basada en la OUR ($X_{OUR,i}$) es fa servir la definició de la velocitat específica de consum d'oxigen (veure Equació 5.13). En canvi, l'estimació de la velocitat específica de creixement en línia ($\mu_{OUR,i}$) es realitza anàlogament a la velocitat específica de creixement màxima (veure Equació 5.9), però a partir de la regressió dels quatre últims valors de OUR emmagatzemats.

A la Figura 5.18 i la Taula 5.7, es presenten els principals elements que descriuen la recepta PERF, descrita de forma més detallada a l'apartat 10.1.2 del capítol d'apèndix.

El seu principi de funcionament no difereix sensiblement del descrit a la recepta BATCH (veure Figura 5.10 i Taula 5.4). Malgrat tot, es diferencia per la introducció en la fase "Procés PERFUSIÓ" d'una nova transició anomenada "Estratègia", la qual és modificable per l'usuari. En funció del seu valor, la recepta pot operar en discontinu a la fase inicial del cultiu, o bé en perfusió pròpiament dita, amb el càlcul del cabal de perfusió i l'activació de les bombes d'addició i d'extracció, aquesta última associada al control de nivell.

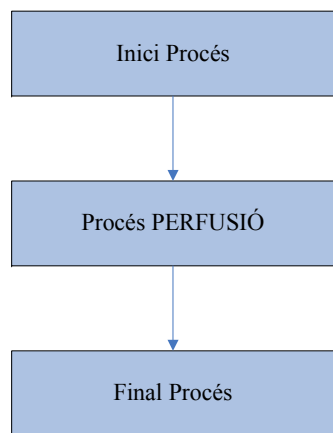
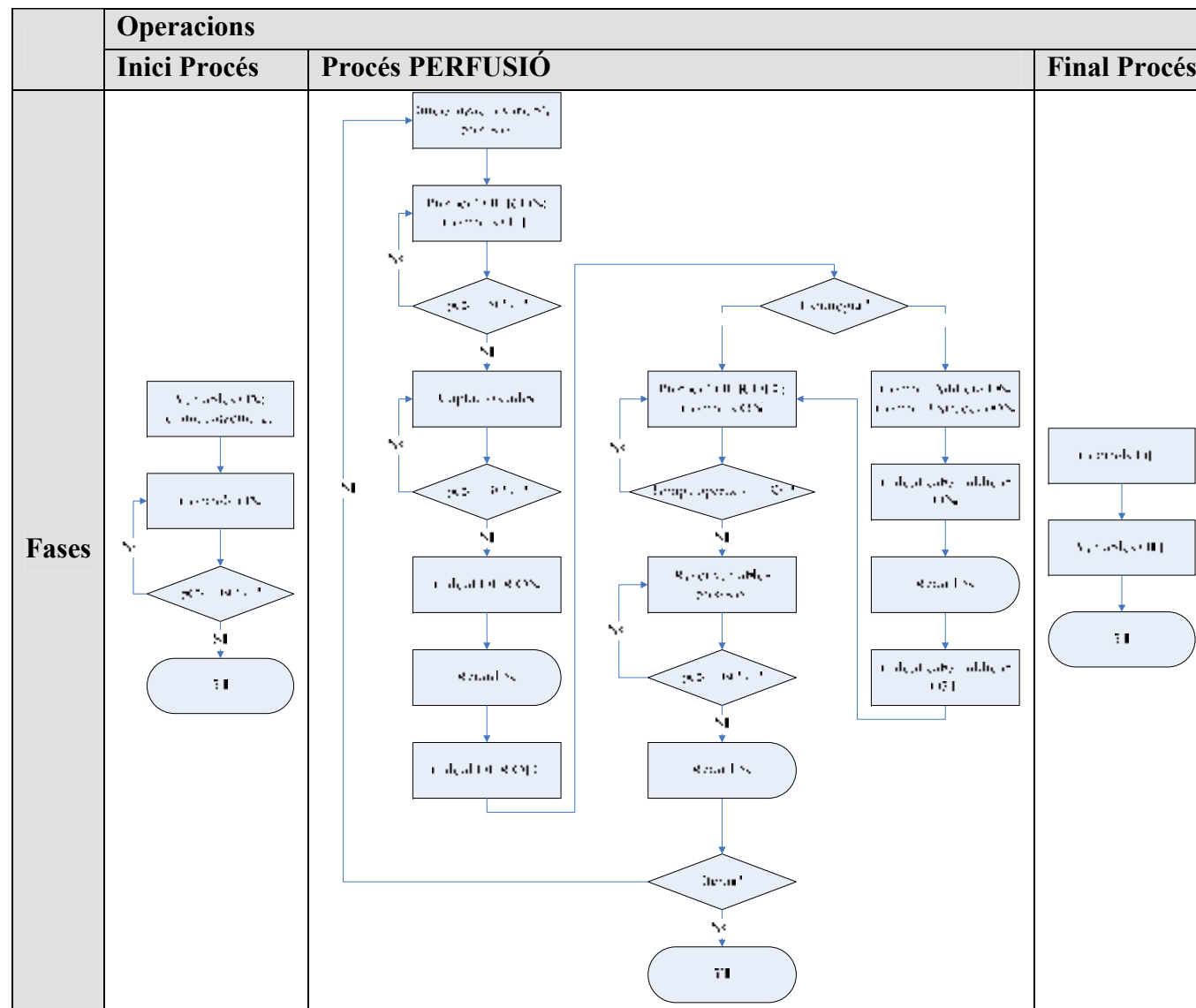


Figura 5.18. Diagrama d'operacions que componen la recepta PERF per a l'operació en continu amb perfusió.



Taula 5.7. Diagrama de flux de les fases que integren cadascuna de les operacions de la recepta PERF.

5.4.3.2. Caracterització de la producció en continu amb perfusió

A diferència de l'estratègia de producció en discontinu, on es fa necessari realitzar un cultiu previ sense infecció per avaluar les limitacions del medi i determinar la concentració d'infecció, com s'ha comentat, l'estratègia de producció en continu amb perfusió pot mantenir el cultiu en la fase de creixement cel·lular teòricament de forma indefinida. No obstant, a la pràctica existeixen limitacions de tipus tècnic associades a elements del sistema de cultiu convencional que restringeixen la màxima densitat cel·lular que es pot assolir. Entre aquests, el factor limitant més usual és el sistema d'aeració. Per aquesta raó, és convenient analitzar quina seria la màxima concentració cel·lular que hom podria aconseguir en el cultiu en continu amb perfusió, en funció del límit imposat per la capacitat d'aportació d'oxigen del sistema.

La capacitat del sistema d'aeració, basat en el difusor de bombolles, s'avalua gràcies a la determinació del coeficient volumètric de transferència d'oxigen (k_{La}). Existeix una àmplia bibliografia publicada sobre els diferents mètodes emprats per a la determinació experimental del k_{La} , encara que tots ells parteixen de la formulació i el tractament del balanç de matèria per a l'oxigen en el bioreactor que té la següent expressió:

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = k_{La}(C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) - q_{O_2} \cdot X_v$$

Equació 5.20. Balanç de matèria aplicat a l'oxigen per a un bioreactor, on: C_{O_2} és la concentració d'oxigen en la fase líquida, k_{La} és el coeficient volumètric de transferència d'oxigen, $C_{O_2}^*$ és la concentració d'oxigen en la fase líquida corresponent a la saturació, q_{O_2} és la velocitat específica de consum d'oxigen, X_v és la concentració de cèl·lules viables, t és el temps.

El mètode més estès es basa en l'eliminació de gasos i posterior reaeració. Aquesta senzilla tècnica consisteix en l'operació del bioreactor sense cèl·lules, però en les condicions més similars possibles al cultiu. Per portar-la a terme, es redueix la concentració d'oxigen mitjançant un corrent de nitrogen gas fins a eliminar completament l'oxigen del medi, seguidament s'introdueix un corrent d'aire o oxigen al bioreactor a través del sistema d'aeració a caracteritzar i es mesura l'evolució temporal de l'oxigen dissolt [78]. Durant aquesta etapa, l'Equació 5.20 es pot expressar com:

$$\ln\left(1 - \frac{C_{O_2}(t)}{C_{O_2}^*}\right) = -k_{La}t$$

Equació 5.21. Expressió per determinar el valor del coeficient volumètric de transferència d'oxigen (k_{La}), on: C_{O_2} és la concentració d'oxigen en la fase líquida, k_{La} és el coeficient volumètric de transferència d'oxigen, $C_{O_2}^*$ és la concentració d'oxigen en la fase líquida corresponent a la saturació, t és el temps.

De manera que, el valor del k_{La} s'obté del pendent de la representació lineal del logaritme neperià de la concentració d'oxigen dissolt ($\ln(C_{O_2}(t))$) respecte el temps. Aquestes determinacions ja han estat efectuades per a aquest mateix bioreactor convencional en treballs previs [34], en el mateix rang de condicions experimentals, i per tant es disposa de valors experimentals que oscil·len en un rang d'entre 10 h^{-1} i 20 h^{-1} .

Com a conseqüència, l'ús del difusor de bombolles té un efecte directe sobre la capacitat per transferir oxigen des de la fase gas fins al sí del medi de cultiu i, per tant, sobre la concentració màxima de cèl·lules viables que aquest sistema d'aeració pot sustentar. Per determinar-la, cal considerar el balanç de matèria per a l'oxigen (veure Equació 5.20) en estat estacionari i igualar els termes de transferència i de consum d'oxigen, tot obtenint la següent expressió:

$$k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) = q_{O_2} \cdot X_{V,m\grave{a}x}$$

Equació 5.22. Expressió del balanç de matèria per a l'oxigen en estat estacionari, on: C_{O_2} és la concentració d'oxigen en la fase líquida, $k_L a$ és el coeficient volumètric de transferència d'oxigen, $C_{O_2}^*$ és la concentració d'oxigen en la fase líquida corresponent a la saturació, q_{O_2} és la velocitat específica de consum d'oxigen, $X_{V,m\grave{a}x}$ és la concentració de cèl·lules viables màxima.

Es pren com a valor de consigna per a l'oxigen dissolt el fixat en la producció en discontinu del 50% ($C_{O_2} = 0,5 \cdot C_{O_2}^*$); s'assumeix que per a medis de cultiu cel·lular a 37 °C, la concentració de saturació ($C_{O_2}^*$) amb aire ha estat calculada per alguns autors, essent el seu valor constant i igual a 0,194 mM [79-81] i, finalment, que la velocitat de consum específic d'oxigen (q_{O_2}) avaluada fins al moment per a la línia cel·lular HEK293S en la fase de creixement és de 125 nmol/(10⁶ cell·h) (veure Taula 5.6). Substituint el resultat mitjà del $k_L a$ de 15 h⁻¹ i la resta de valors en l'Equació 5.22, s'obté que el bioreactor podria arribar a suportar una densitat cel·lular màxima ($X_{V,m\grave{a}x}$) de l'ordre de 100·10⁵ cell/mL.

Conegut aquest límit i tenint en consideració publicacions anteriors com la de Cortin i col. [52] que també operen en perfusió, es decideix fixar una concentració d'infecció a 80·10⁵ cell/mL, la qual és propera al límit del sistema de cultiu, però situada encara en la fase de creixement exponencial, sense haver de realitzar un experiment específic amb aquest objectiu. Tot i això, existeix una segona finalitat per la qual el cultiu sense infecció sí que esdevé necessari. Aquesta consisteix en la posada a punt del protocol d'infecció. Malgrat que cal tenir molt present que el comportament postinfecció de la línia cel·lular no serà real, ja que la cèl·lula infectada modifica la seva fisiologia i metabolisme, l'aplicació del protocol proporcionarà valuosa informació que servirà com a punt de partida per al procés d'infecció autèntic.

El protocol d'infecció es fonamenta en la modificació de l'estratègia de producció en continu amb perfusió a partir del moment d'infecció, per tal de minimitzar la quantitat de virus que pot abandonar el sistema a través del filtre de fibres buides i per tal d'assegurar que, en tot moment, les cèl·lules es trobin en un estat fisiològic favorable que maximitzi la productivitat vírica. Bàsicament existeixen dues possibles estratègies d'infecció.

La primera, emprada per Henry i col., es basa en no actuar sobre el sistema de perfusió i augmentar la multiplicitat d'infecció per assumir la pèrdua vírica a través del filtre de fibres

buides [55]. Aquesta possibilitat es descarta, ja que implica un augment de l'inòcul víric que es perdrà, tot augmentant els costos del procés global. En canvi, la segona estratègia consisteix en aturar el sistema de perfusió durant un determinat període de temps, un cop el cultiu és infectat per permetre l'accés de la màxima quantitat de virus a l'interior de les cèl·lules. Aquesta opció ha estat emprada amb altres línies cel·lulars com la HeLaS3 per part de Yuk i col. [56], però no en la línia cel·lular HEK293S.

Donat que es disposa posar en pràctica aquesta última alternativa, cal determinar una sèrie de paràmetres a l'hora d'iniciar el protocol, el més important dels quals és l'esmentat temps d'aturada de la perfusió, que s'ha de fixar en relació amb el temps de penetració de l'adenovirus a l'interior de la cèl·lula. D'acord amb Greber i col. i Nakano i col., aquest és de 2 h postinfecció [82, 83]; un valor que pràcticament concorda amb el temps d'aturada de 3 h postinfecció que utilitzen Yuk i col. durant la perfusió [56]. Considerant les corbes d'infecció realitzades en el capítol anterior del present treball, aquest temps oscil·la de les 4 a les 12 h postinfecció; de manera que es decideix aplicar una aturada mínima del sistema de perfusió de 6 h, més enllà resultaria un temps excessiu per deixar un cultiu molt concentrat sense aliment.

Relacionat amb aquest paràmetre, es troba la concentració de glucosa prèvia a la infecció que s'ha d'assolir per evitar que el cultiu es trobi en condicions limitants que puguin afectar la productivitat cel·lular, durant el temps d'aturada. Aquest valor es pot calcular a partir de la resolució dels balanços de matèria en discontinu (veure Equació 5.6 i Equació 5.7) suposant que durant el curt període d'aturada a l'inici de la infecció, la concentració de cèl·lules viables continuarà comportant-se amb la mateixa velocitat de creixement. Si es fa aquesta suposició, es pren la concentració d'infecció de $80 \cdot 10^5$ cell/mL i els paràmetres cinètics de la Taula 5.6, provinents del cultiu en discontinu amb infecció ($\mu_{\max} = 0,0305 \text{ h}^{-1}$ i $q_{\text{Gluc}} = 270 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cell} \cdot \text{h})$), s'obté un valor de concentració de glucosa de 14,2 mM.

Un cop superat el període d'aturada, existeixen dues opcions per reactivar la perfusió i evitar que les cèl·lules restin sense nutrients durant la resta del procés d'infecció. La primera consisteix en mantenir un cabal constant d'alimentació fins al final de la producció; és una opció més senzilla, però pot malmetre medi, si no es calcula amb exactitud el valor d'aquest cabal. La segona opció es basa en tornar el control a la recepta PERF, la qual ajusti el cabal de perfusió i continuï alimentant en funció de la OUR. Caldrà avaluar totes dues alternatives.

El protocol d'infecció no provoca cap modificació sobre la recepta PERF abans descrita, ja que les accions es realitzen de forma manual i, per tant, no cal introduir cap nova fase en les operacions, ni modificar-ne alguna ja existent.

El resultat obtingut del cultiu amb el sistema convencional de producció operant en continu amb perfusió sense infecció, el qual serveix de referència per descriure el comportament de la línia cel·lular davant de l'estratègia d'infecció, es presenta a la Figura 5.19. Es realitza en les mateixes condicions que el cultiu en discontinu: medi 293 SFMII, suplementat amb 4 mM de

glutamina i 50 ppm d'antiescumejant C, i es desenvolupa sota les mateixes consignes de control emprades durant la producció en discontinu: temperatura de 37 °C, concentració d'oxigen dissolt de 50%, pH de 7,1 i agitació de 75 rpm.

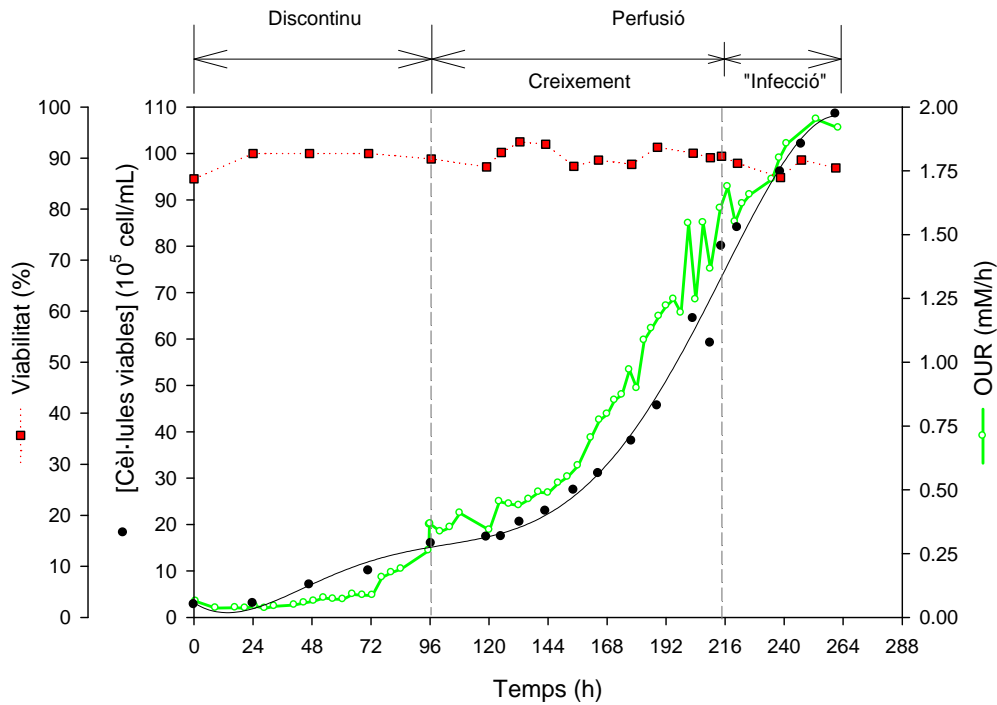


Figura 5.19. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de OUR (—) i de viabilitat cel·lular (■) en un cultiu en perfusió en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

El cultiu s'inocula amb $2,7 \cdot 10^5$ cell/mL utilitzant cèl·lules a la meitat de la fase de creixement exponencial, provinents d'un procés d'escalat en flascó agitad. La perfusió no es pot iniciar immediatament, ja que es desaprofitaria el medi d'inoculació i, a més, és necessària l'acumulació d'una certa densitat cel·lular per suportar l'estrès derivat. Per tant, l'experiment comença en discontinu, i cal establir el criteri temporal a partir del qual activar la perfusió abans que el cultiu arribi a la seva fase estacionària.

Tenint en compte que es disposa de dades de la producció en discontinu sense infecció (veure Figura 5.11), l'inici de la perfusió s'estableix en base a la concentració cel·lular màxima durant la fase exponencial, aproximadament entre $10 \cdot 10^5$ cell/mL i $12 \cdot 10^5$ cell/mL, juntament amb la tendència descrita per la corba de OUR en aquell instant, indicativa de l'activitat cel·lular.

L'etapa de funcionament en discontinu progressa, doncs, fins a les 96 h de cultiu, moment on la concentració cel·lular assoleix un valor de $16 \cdot 10^5$ cell/mL i la tendència de la OUR és creixent. Com a conseqüència, es decideix que és el moment per iniciar la fase d'acumulació cel·lular en perfusió fins arribar a la concentració d'infecció: s'activa la circulació del cultiu a través del filtre de fibres buides amb una velocitat de recirculació de 100 mL/min i el programa de control comença a addicionar medi fresc al sistema segons l'Equació 5.19. L'evolució de la densitat cel·lular arriba a la concentració d'infecció de $80 \cdot 10^5$ cell/mL

aproximadament a les 216 h. No obstant, des de l'inici de la perfusió fins aproximadament les 130 h s'observa una lleugera tendència a l'estabilització de la corba de creixement del cultiu.

Aquest fenomen pot ser degut a l'entrada en funcionament del sistema d'aeració intensiu per bombolleg directe (via *sparger*). Tot i la presència de surfactants polimèrics al medi 293 SFMII, l'esclat de bombolles a la superfície del fluid pot provocar processos de lisi cel·lular, els quals afecten la velocitat específica de creixement. D'altra banda, la circulació de les cèl·lules a través del filtre de separació, com s'ha comentat a l'apartat anterior, genera un estrès tallant, avaluable a través de l'Equació 5.17, que també pot tenir conseqüències negatives per al cultiu. En concret, amb el valor del cabal de recirculació (100 mL/min) i coneixent les característiques del filtre de fibres buides CellFlo de 620 cm² (veure especificacions dins de l'apartat 9.5.1.4 del capítol de materials i mètodes), es calcula un temps de residència dins del filtre de 10 s i una velocitat de cisallament (γ) de 179 s⁻¹, valor que es troba lluny dels límits recomanats abans d'observar una possible pèrdua de viabilitat cel·lular, 1.300 s⁻¹ [75] i 3.000 s⁻¹ [76], però que tot i així poden afectar l'evolució inicial del cultiu.

Tant durant l'etapa en discontinu com durant la fase de creixement de l'etapa de perfusió, la viabilitat cel·lular no abandona els valors superiors al 90%. Pel que fa a la OUR, es realitzen mesures cada 3 h; el seu perfil és paral·lel al de concentració cel·lular, amb un valor en el moment de la infecció de 1,68 mM/h a les 216 h de cultiu. Al llarg de la fase de creixement, s'incrementa paulatinament l'agitació des de les 75 rpm fins a les 100 rpm, ja que a partir de 50·10⁵ cell/mL es comencen a observar estrats cel·lulars deguts a l'elevada concentració que comença a haver en el bioreactor.

Com s'ha dit, la fase suposadament d'infecció comença a partir de les 216 h. Com és d'esperar, no s'observa cap efecte visible en cap dels perfils al llarg de les 48 h postinfecció que es perllonga el temps de recollida. Malgrat tot, a partir de les 235 h, el filtre de fibres buides comença a donar símptomes d'obturació, degut a la possible presència d'agregats cel·lulars acumulats a l'interior de les fibres. Davant d'aquesta situació, s'utilitza de forma reiterada un procediment anomenat de retroneteja, gràcies al qual es fa circular per l'exterior de les fibres medi fresc que exerceixi pressió en la paret de les mateixes en un sentit oposat al del flux de filtració, amb l'objectiu de desprendre el pastís de filtració generat.

A la Figura 5.20, es mostren els perfils relacionats amb l'addició de medi fresc al llarg del cultiu i el volum total de medi alimentat, en relació amb el perfil de OUR en línia. Com es pot observar, el perfil de la velocitat de perfusió, i en conseqüència del cabal alimentat, s'adapta perfectament a la corba de demanda d'oxigen. Aquest bon ajust reforça la fiabilitat de l'algoritme de control, traduint-se en un volum total alimentat durant la fase de creixement de 10,6 L de medi fresc.

Les accions per aplicar el protocol d'infecció comencen a les 188 h de cultiu. A partir

d'aquest instant, es produeix un increment més pronunciat del cabal d'alimentació, degut a la modificació de la concentració de glucosa residual de 5 mM fins a 14 mM. La raó principal d'aquesta decisió és coordinar l'evolució de la concentració cel·lular de $46 \cdot 10^5$ cell/mL i la de glucosa, perquè en el començament de la infecció ambdues presentin els valors desitjats.

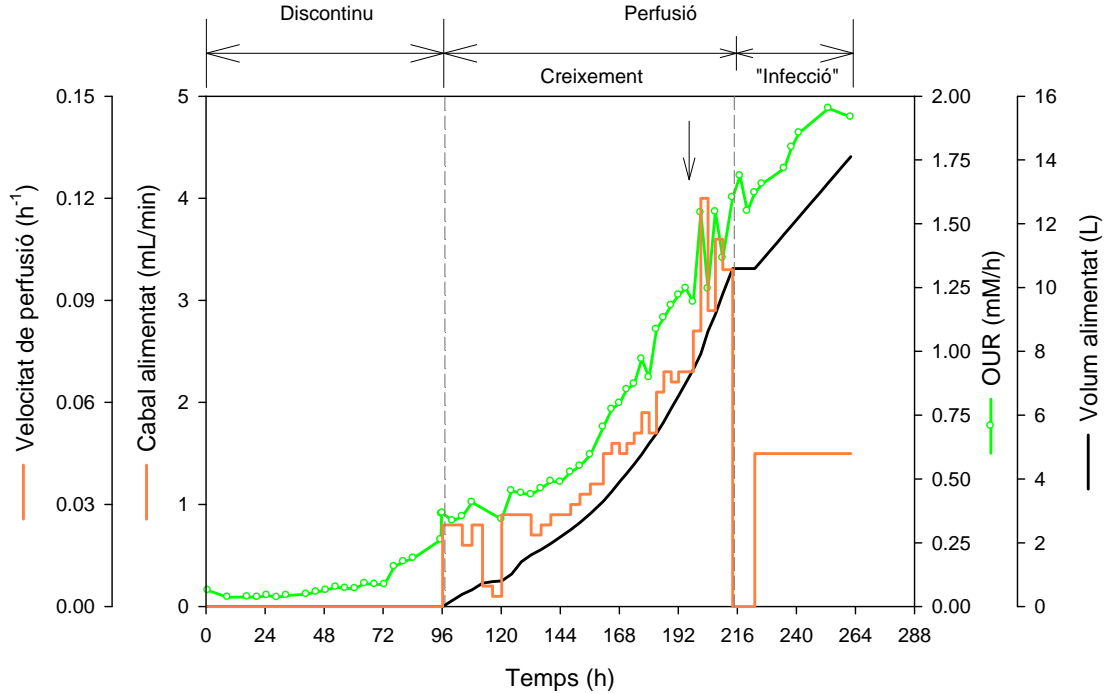


Figura 5.20. Perfils de cabal alimentat (—), de OUR (—), de velocitat de perfusió (—) i de volum total alimentat (—) en el cultiu en perfusió en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII sense infecció. La sageta indica el moment on la concentració residual de glucosa es modifica per començar el protocol d'infecció.

Finalment, el TOI es dona aproximadament a les 216 h, a partir de les quals es mostra el període d'aturada de 6 h del sistema d'alimentació per minimitzar l'escapament d'adenovirus a través del filtre. Posteriorment i per recuperar les concentracions de nutrients, es decideix mantenir un cabal constant igual a 1,5 mL/min, ja que aquest ha estat el valor mitjà al llarg de tota la fase de creixement.

A la Figura 5.21, es mostren els perfils de metabòlits, els quals reflecteixen les addicions descrites a la figura anterior. En el cas de la producció en continu amb perfusió, els perfils de metabòlits aporten informació addicional respecte el cas en discontinuu, ja que demostren que el control de la velocitat de perfusió manté la concentració de nutrients en el bioreactor a nivells suficients com per evitar l'esgotament de cap d'ells i/o l'acumulació de subproductes tòxics a concentracions que resultin inhibidores.

Les concentracions de glucosa i lactat a l'inici de l'experiment són de 20 mM i 7,9 mM respectivament. S'aprecia com la perfusió s'activa en el moment que el cultiu s'aproxima a nivells d'exhauriment de nutrients, la qual cosa succeeix a les 96 h de cultiu amb una concentració de glucosa residual de 4.1 mM. A partir d'aquest instant, aquesta última es

recupera, i es manté al voltant del valor de consigna (5 mM); la concentració de lactat es dilueix i se situa en un rang de concentracions poc inhibitori al voltant de 22 mM.

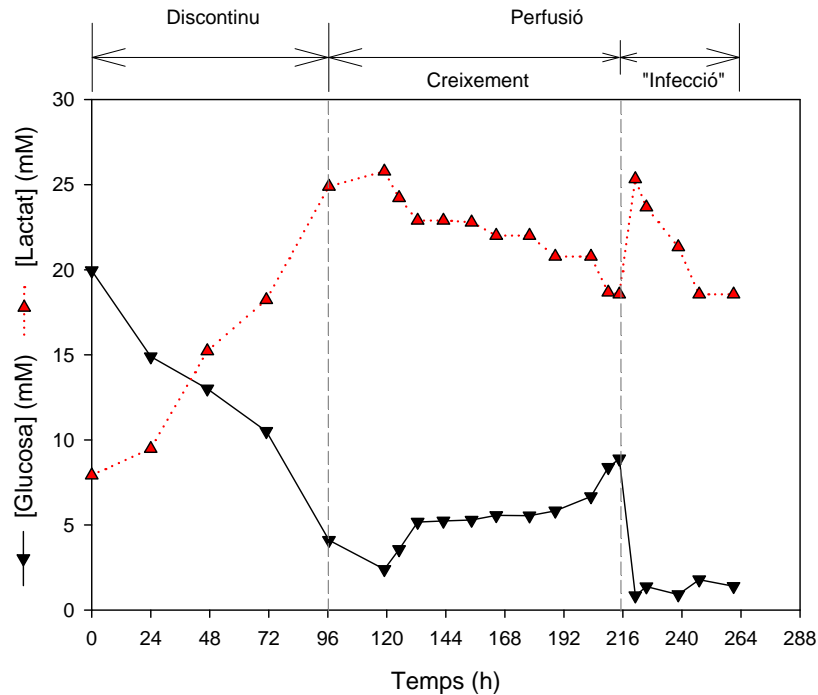


Figura 5.21. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en perfusió en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

A la figura anterior, es reflecteix l'aplicació del protocol d'infecció. Així, s'observa l'efecte del canvi en la consigna de glucosa al medi de perfusió de 5 mM a 14 mM, 28 h abans de l'inici suposat de la infecció. Malgrat tot, la dinàmica d'addició del sistema no és prou ràpida, de manera que en aquest interval de temps, quan ja es disposa de la densitat d'infecció (veure Figura 5.19), la concentració de glucosa encara és de 8,9 mM. No obstant, durant el període d'aturada no s'arriba a exhaurir la totalitat de nutrients del medi i la concentració de glucosa es redueix fins a 0,84 mM; en no existir infecció real, el consum específic de les cèl·lules no és tan alt com era d'esperar i, previsiblement per aquesta raó, no es consumeixen tots els nutrients. La posterior reactivació de la velocitat de perfusió constant atura la caiguda de la concentració de nutrients, però no aconsegueix recuperar la concentració de glucosa a 5 mM, degut a l'elevada densitat cel·lular que assoleix el cultiu de $108 \cdot 10^5$ cell/mL (veure Figura 5.19). Aquest fet obligarà en els següents cultius a augmentar el cabal d'addició.

Es pot concloure que l'aplicació simulada del protocol d'infecció proporciona informació molt valuosa sobre les accions a realitzar en el cultiu, les quals permeten efectuar el temps d'aturada sense exhaurir la totalitat dels nutrients, encara que és necessari modificar l'estratègia per recuperar la concentració de glucosa postinfecció.

5.4.3.2.1. Cultiu amb infecció

Els problemes de funcionament del filtre de fibres buides observats al final del cultiu anterior, basats en indicis d'obturació, obliguen a substituir el model emprat. Així, per augmentar el

grau de robustesa i evitar riscos de seguretat durant la perfusió, s'utilitza un model sobredimensionat: un filtre Xampler (GE Healthcare) de 1.200 cm² d'àrea, però amb el mateix diàmetre de porus (0,2 µm) (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.5.1.4 del capítol de materials i mètodes).

El resultat obtingut del cultiu amb infecció emprant el sistema convencional operant en continu amb perfusió es presenta a la Figura 5.22. Aquest experiment es realitza en les mateixes condicions que el cultiu en perfusió sense infecció, tant pel que fa a la composició del medi com a les consignes de les variables de control.

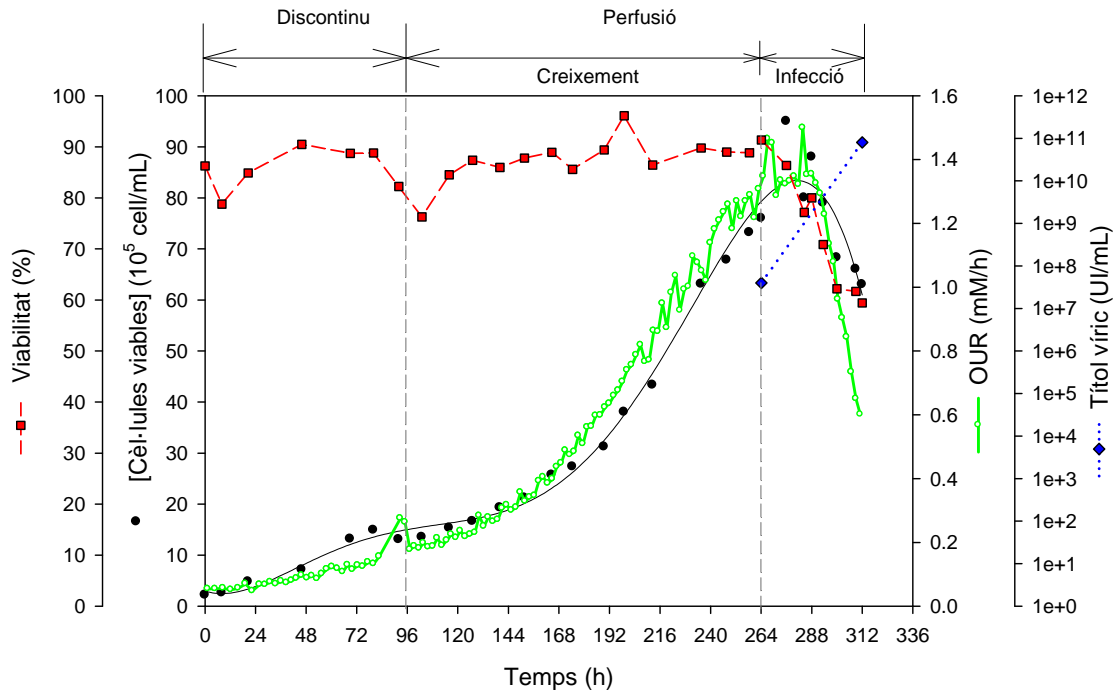


Figura 5.22. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de OUR (—), de viabilitat cel·lular (■) i de títol víric (◆) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

L'etapa de funcionament en discontinu s'inicia amb un inòcul de $2,2 \cdot 10^5$ cell/mL que evoluciona fins a les 96 h amb una densitat cel·lular de $13 \cdot 10^5$ cell/mL i una concentració residual de glucosa i lactat de 9,7 mM i 15,8 mM respectivament. Considerant també l'increment progressiu del perfil de OUR, es decideix donar començament a l'etapa de perfusió. La fase de d'acumulació cel·lular es perllonga fins a les 264 h de cultiu on s'obtenen $76 \cdot 10^5$ cell/mL. En comparació amb l'anterior experiment, existeix un retard de 48 h abans de passar a la fase d'infecció. En efecte, es percep igualment el procés d'estabilització del cultiu, degut probablement a la seva adaptació a les noves condicions de perfusió, encara que la durada d'aquest període és lleugerament superior en comparació amb la Figura 5.19. Donat que es fa servir el mateix sistema d'aeració, la principal hipòtesi per al perllongament de la fase de creixement és l'augment de l'estrès tallant per la circulació a l'interior del filtre de fibres buides.

Per mantenir constant el temps de residència del cultiu dins del filtre en 10 s, la velocitat de

recirculació durant l'experiment s'augmenta a 180 mL/min. D'aquesta manera, la nova velocitat de cisallament (γ) és de 240 s^{-1} , un valor més elevat que el del cultiu precedent, tot i que encara prou baixa en relació amb els valors bibliogràfics.

D'altra banda, l'estat fisiològic del cultiu inoculat també podria tenir algun efecte, ja que durant l'etapa en discontinu i la primera fase de la perfusió, la viabilitat cel·lular es troba en alguns moments per sota del 90%. Les mesures cada 3 h per constituir el perfil de OUR mostren com s'adapta en tot moment a l'evolució de la densitat cel·lular; en aquest cas, el valor assolit per donar començament a la infecció és de 1,4 mM/h. Certament, aquest és menor que el descrit en el cultiu anterior (1,68 mM/h), la qual cosa pot confirmar que el nivell d'activitat cel·lular és lleugerament inferior respecte l'anterior cultiu.

La fase d'infecció correspon a les últimes 48 h de cultiu, fet que allarga l'experiment fins a les 312 h. De manera anàloga a la producció en discontinu, un cop es posen en contacte les cèl·lules amb l'aliquota que conté la multiplicitat d'infecció seleccionada (5 UI/cell), s'observa l'existència d'un repunt de la concentració fins a $95 \cdot 10^5$ cell/mL a les 12 h postinfecció (276 h de cultiu) per decreixer fins al final del cultiu, juntament amb la viabilitat cel·lular, fins a $63 \cdot 10^5$ cell/mL i un 59% respectivament. El perfil de OUR perllonga el seu període d'augment i d'estabilització, respecte el comportament prèviament descrit en discontinu, fins a les 24 h postinfecció i pren un valor màxim de 1,5 mM/h per caure definitivament a partir de les 288 h. Per tant, les cèl·lules es troben considerablement actives, com a mínim, durant la meitat del cicle infectiu, la qual cosa pot resultar a priori en una major productivitat específica cel·lular.

Cal esmentar que en aquest experiment no es disposa de la corba d'infecció, ja que només s'han pogut analitzar els valors de títol víric inicial i final, com es mostra a la Figura 5.22. La possible manipulació errònia de les mostres intermèdies a titular podria ser la causa d'aquest fet. Malgrat tot, el títol víric al temps de recollida és de $8 \cdot 10^{10}$ UI/mL. És complex comparar la dada obtinguda amb treballs publicats on s'aplica la mateixa estratègia de producció, ja que alguns d'aquests articles determinen el títol víric en base a partícules físiques virals (PV), en comptes d'unitats infectives (UI). Com es veurà al següent capítol, no totes les unitats físiques són infectives, degut a que la formació del virió no és completa en molt casos, donant lloc a partícules immadures i a una relació variable entre unitats infectives i virals. La resta de paràmetres d'infecció es troben resumits a la Taula 5.8.

Paràmetres d'infecció	
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	7,6
MOI teòrica / real (UI/cell)	5 / 5
TOH (h postinfecció)	48
[Títol víric] ₀ (10^6 UI/mL)	40
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	80
$P_{específica}$ (UI/cell)	10.500

Taula 5.8. Paràmetres d'infecció en el sistema convencional operant en continu amb perfusió.

A nivell macroscòpic, a la Figura 5.23 es mostra una fotografia del cultiu en el moment de recollida; queda patent la coloració verdosa, deguda a l'elevat nivell de producció de proteïna GFP que es produeix al bioreactor.



Figura 5.23. Detall de la producció en continu amb perfusió: cultiu al final de la fase d'infecció, destaca el color verdós característic de l'elevat nivell d'expressió de la proteïna GFP, respecte la coloració original del medi de cultiu.

A la Figura 5.24, es mostren els perfils relacionats amb l'addició de medi fresc al llarg de l'experiment.

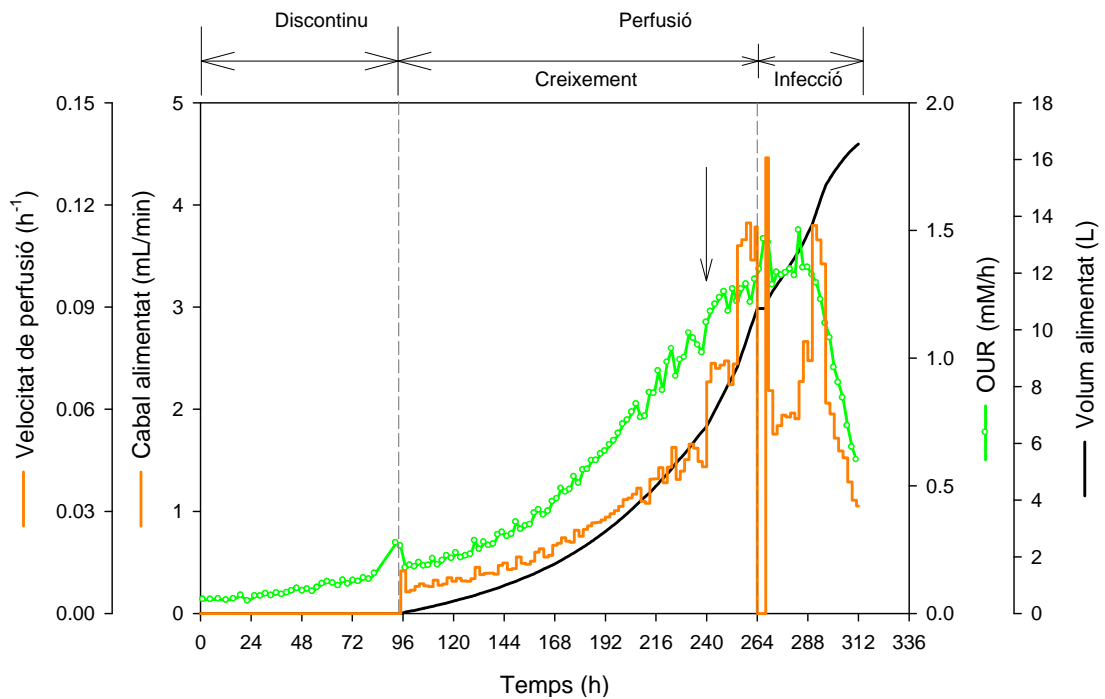


Figura 5.24. Perfils de cabal alimentat (—), de OUR (—), de velocitat de perfusió (—) i de volum alimentat (—) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment on la concentració residual de glucosa es modifica per començar el protocol d'infecció.

Tal i com succeeix a l'anterior cultiu sense infecció, la Figura 5.24 torna a mostrar com la velocitat de perfusió i el cabal d'aliment es comporten d'acord amb la corba de OUR fins que comença la fase d'infecció, moment on s'han addicionat 10,7 L de medi fresc.

En aquest experiment, el protocol d'infecció s'activa a partir de les 240 h de cultiu (24 h abans de la infecció) amb la modificació de la concentració residual de glucosa de 5 mM a 14 mM, fet que es tradueix en l'augment del cabal d'aliment fins a 4 mL/min, previ al moment d'infecció. Després del període d'aturada, es torna a reactivar l'alimentació, en aquest cas, per mitjà de l'algoritme d'addició, en espera que l'augment de la demanda d'oxigen per part de la cèl·lula infectada controlï l'increment en l'addició de nutrients. Tot i així, per facilitar la recuperació del sistema més ràpidament, durant les dues hores que segueixen l'aturada (270 h a la 272 h de cultiu), la consigna de glucosa es fixa a 15 mM, la qual cosa incrementa el cabal fins a 4,5 mL/min. Posteriorment, la consigna es torna a situar a 5 mM. Malgrat tot, el comportament ja estable de la OUR postinfecció no és capaç de mantenir el cabal de perfusió en un valor elevat i aquest roman al voltant de 1,9 mL/min. De manera que, a partir de les 284 h, a banda de modificar novament la consigna de concentració, la qual cosa provoca un repunt del cabal de fins a 3,8 mL/min, però una variació molt lenta en les concentracions de glucosa i lactat, és necessari realitzar varies addicions puntuals de medi fresc de forma manual.

D'acord amb els perfils de glucosa i lactat (veure Figura 5.25), es distingeixen perfectament les diferents fases per les que passa el cultiu. La concentració de glucosa i lactat a l'inici de l'experiment és de 20 mM i 7,9 mM respectivament i evolucionen en l'etapa en discontinuu fins a 9,7 mM i 15,8 mM.

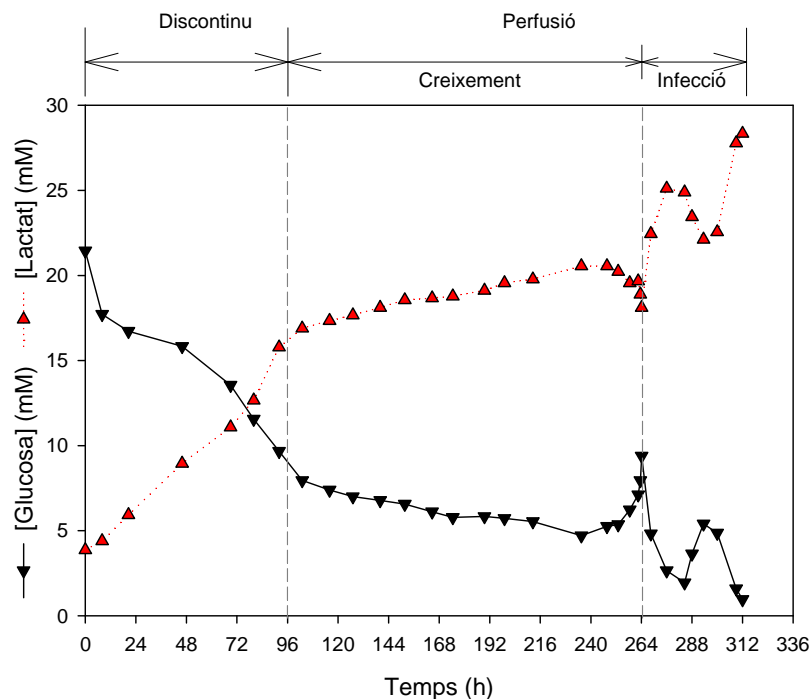


Figura 5.25. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

En donar començament la perfusió, la concentració de glucosa decau paulatinament i s'estabilitza al voltant del valor residual de 5 mM, mentre que la de lactat ho fa en 20 mM. Com es comenta anteriorment, el protocol d'infecció s'activa a partir de les 240 h de cultiu (24 h abans de la infecció), l'increment del cabal aconseguix una concentració de glucosa prèvia a la infecció de 9,4 mM que davalla fins a 4,5 mM durant el temps d'aturada. A la vista del perfil de creixement d'aquesta producció (veure Figura 5.22), es creu que el cultiu no esgota els nutrients durant l'aturada, degut probablement a que l'estat fisiològic de les cèl·lules previ a la infecció no és tan actiu com en el cultiu anterior sense infecció.

A partir de la fase d'infecció, els perfils erràtics de metabòlits posen en evidència la incapacitat de la OUR per ajustar la velocitat de perfusió i mantenir el nivell de glucosa constant en 5 mM.

Davant dels problemes per ajustar el cabal d'aliment durant la fase d'infecció i per corroborar les dades de titulació obtingudes, s'arriba a la conclusió que és necessari realitzar un nou experiment de perfusió amb infecció, on la recuperació de la concentració de nutrients després de l'aturada es porti a terme mitjançant un cabal constant, el qual, a diferència de la perfusió sense infecció, ha d'ésser determinat atenent als paràmetres cinètics adquirits fins al moment.

Per realitzar el segon procés de producció en continu amb perfusió, es disposa d'un nou conjunt de mòduls de microfiltració CellFlo (Spectrum Laboratories) de 2.000 cm² i 0,2 µm de mida de porus (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.5.1.4 del capítol de materials i mètodes).

A la Figura 5.26 es mostren els perfils de concentració i viabilitat cel·lulars, OUR en línia i la corba de titulació vírica per al segon experiment de producció de vectors adenovirals emprant el sistema convencional operant en continu amb perfusió.

L'evolució de les variables que conformen aquesta figura és essencialment molt similar a les de l'experiment anterior (veure Figura 5.22), tot i que la durada global del procés és de 248 h, 64 h menys que en el cas anterior. A diferència dels anteriors experiments, l'etapa de funcionament en discontinu s'inicia amb un inòcul aproximadament dues vegades superior de $4,2 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual cosa fa que la concentració a les 68 h sigui de $26,6 \cdot 10^5$ cell/mL, la més alta observada en aquest instant. Aquest fet provoca l'avançament de la perfusió a les 73 h de cultiu, moment on es recupera la mesura de OUR, perduda accidentalment degut a un error en el subministrament de nitrogen des de les 61 h de cultiu.

Durant la fase d'acumulació cel·lular, la velocitat de recirculació necessària per no modificar el temps de residència en el filtre (10 s) és de 300 mL/min, la qual cosa proporciona una velocitat de cisallament igual a 166 s^{-1} , aproximadament un 30% inferior al valor del cultiu previ. Malgrat tot, la concentració cel·lular, així com la viabilitat, decreixen lleugerament fins a les 120 h de cultiu. Aquest període de 47 h (de les 73 h fins a les 120 h de cultiu) negatiu per

al creixement té lloc, tot i el baix estrès tallant calculat. Considerant l'elevada concentració a la qual comença la perfusió, la hipòtesi més plausible que justifica l'anòmal comportament és el retard excessiu en donar començament a la perfusió. Aquest fet deixa el cultiu al final del discontinu en la fase estacionària i augmenta encara més la seva dificultat per adaptar-se a la nova etapa. Posteriorment i degut a accions que es descriuen a continuació, la concentració cel·lular es recupera i evoluciona de forma favorable cap a una concentració d'infecció de $78 \cdot 10^5$ cell/mL en assolir les 200 h.

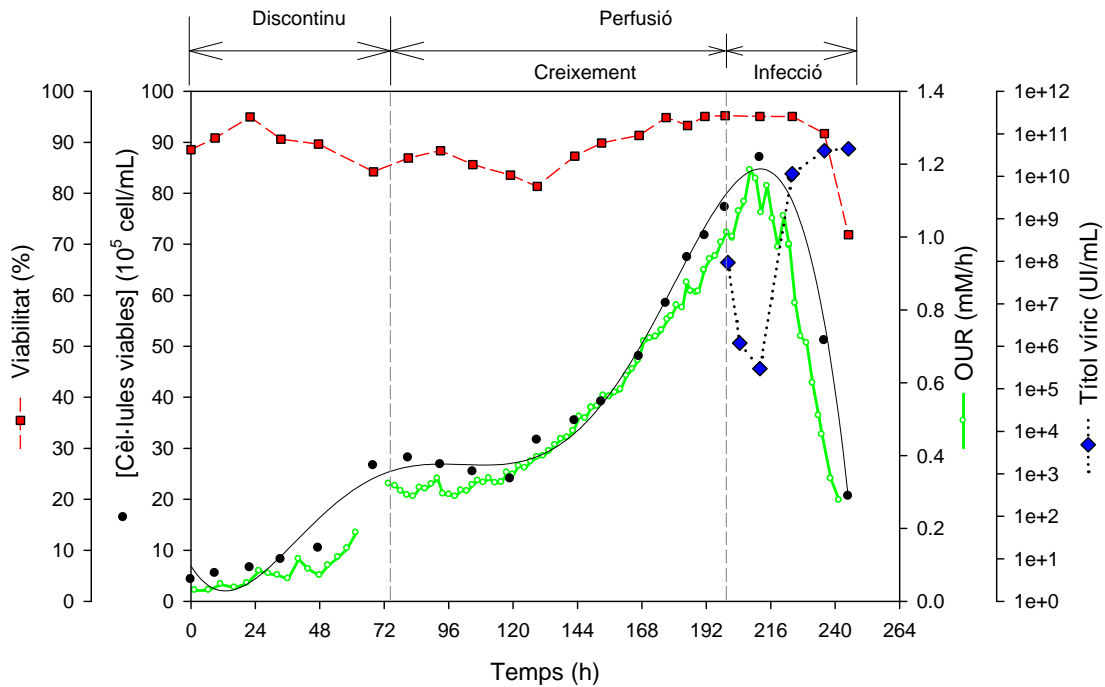


Figura 5.26. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de OUR (—), de viabilitat cel·lular (■) i de títol víric (◆) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

Com en tots els cultius, el perfil de OUR s'ajusta amb fidelitat a l'evolució de la concentració cel·lular viable durant tota l'etapa de creixement.

L'inici de la fase d'infecció amb una MOI de 5 UI/cell ve acompanyada d'una lleugera pujada de la concentració cel·lular, així com de la OUR, fins a un màxim absolut de $87 \cdot 10^5$ cell/mL a les 12 h postinfecció (212 h de cultiu), equivalent a 1,2 mM/h. A posteriori, els valors d'ambdues corbes s'estabilitzen i cauen fins a $21 \cdot 10^5$ cell/mL i 0,28 mM/h al final del cultiu. La viabilitat cel·lular també davalla acusadament fins al 25%. La forma de la corba de titulació confirma la tendència d'aquella determinada en discontinuu: decreix fins a presentar un mínim a les 12 h postinfecció per, posteriorment, recuperar-se fins al moment de recollida i assolir un títol víric màxim, pròxim al determinat en l'anterior infecció, de $4,4 \cdot 10^{10}$ UI/mL.

A la Figura 5.27, es mostra una anàlisi detallada de la corba d'infecció amb la distribució de partícules víriques totals (extracel·lulars i intracel·lulars) respecte aquelles presents només a l'entorn extracel·lular, en el sobrenedant del cultiu.

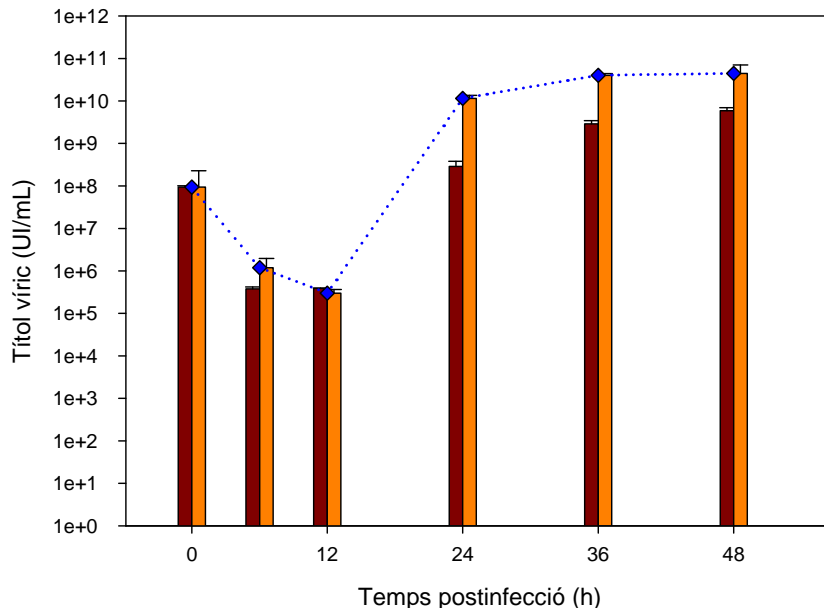


Figura 5.27. Corba d'infecció. Distribució de partícules infectives totals (■) i presents al sobrenedant (■) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

A banda del mínim present en el títol víric degut a la naturalesa del cicle d'infecció del viriò; el tret característic més destacable de l'anterior figura radica en la relació existent entre la quantitat de partícules presents al sobrenedant i les totals. Així, aquesta última s'incrementa del 2,5% de les 24 h postinfecció, fins el 13% a les 48 h postinfecció, doncs a mesura que avança la infecció es produeix un augment de la sensibilitat cel·lular, agreujat encara més per l'estrès tallant, que finalitza en processos de lisi i d'alliberament de més virions al sobrenedant. El valor final se situa en el rang descrit per Altaras i col., entre un 50% i un 10% d'adenovirus fora de la cèl·lula, en aquest moment de la fase infectiva [3]. Aquesta dada és força valuosa, ja que pot afectar la decisió sobre quina fracció final de la producció serà tractada al procés de purificació descrit en el capítol següent, és a dir, si és preferible recollir la totalitat del virus present al brou o, pel contrari, reduir el volum final, tractant només el virus contingut en la fracció cel·lular.

Així mateix, també es disposa de les dades del material víric que travessa els porus del filtre i es concentra en el permeat constituït pel medi exhaurit al llarg de la perfusió. El títol d'aquesta fracció és de $3,83 \cdot 10^7$ UI/mL, determinat en el volum total de 10 L que es genera durant el període d'infecció (veure Figura 5.28). Com a conseqüència, aquesta fracció perduda representa un 0,43% de l'adenovirus total contingut al bioreactor, i es pot considerar menyspreable. Cal esmentar que no tot el virus present al sobrenedant s'ha de trobar homogèniament present al filtrat, ja que bona part pot haver quedat retingut en el pastís de filtració que es forma a les fibres del filtre al llarg de l'operació.

A la Taula 5.9, es recullen els principals paràmetres d'infecció resultants de la producció.

Paràmetres d'infecció	
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	7,8
MOI teòrica / real (UI/cell)	12 / 5
TOH (h postinfecció)	48
[Títol víric] ₀ (10^6 UI/mL)	94
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	44
$P_{específica}$ (UI/cell)	5.600

Taula 5.9. Paràmetres d'infecció en el sistema convencional operant en continu amb perfusió, segona infecció.

Malgrat la reducció aproximadament a la meitat del títol víric final, es confirmen els elevats valors de productivitat respecte l'anterior experiment. A la Taula 5.10, es mostra un resum dels paràmetres d'infecció per a diferents publicacions que utilitzen la perfusió en comparació amb les dades obtingues en el present treball.

Paràmetre	Referència			
	Henry i col. [55]	Yuk i col. [56]	Cortin i col. [52]	Present treball
Línia cel·lular	293SF-3F6	HeLaS3	293S	HEK293S
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	2,4 – 3	9	8	7,8 / 7,6
MOI (UI/cell)	-	-	5	5
(PV/cell)	20	-	-	-
TOH (h postinfecció)	60	40 – 50	60	48
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	-	-	7,8	44 / 80
(10^9 PV/mL)	41 ± 0,6	400	-	-
$P_{específica}$ (UI/cell)	-	-	1.000	5.600 / 10.500
(PV/cell)	17.900 ± 2.400	40.000	-	-

Taula 5.10. Paràmetres d'infecció publicats en diverses referències comparats amb els del present treball de recerca, tots ells obtinguts en sistema convencional operant en continu amb perfusió.

En primer lloc, queda patent la variabilitat en expressar el títol víric entre unitats infectives (UI) i partícules físiques (PV). Tot i no disposar, en aquest moment, de la relació entre UI i PV, com a valor mitjà, es pot considerar que 1 UI equival a 10 PV [2]. Amb aquesta dada de referència, els títols obtinguts en ambdues produccions es troben en la zona alta dels valors publicats.

En aquests treballs es realitzen ajustos manuals de la velocitat de perfusió diàriament. Aquest fet pot portar les cèl·lules, en funció de la seva densitat i consum específic, a trobar-se en períodes puntuals amb limitació de nutrients que perjudiquin el seu estat fisiològic, o bé amb un excés dels mateixos que afavoreixi la generació de subproductes. En el present treball, l'ajust continu, excepte en casos excepcionals, de la velocitat de perfusió ha de beneficiar l'activitat cel·lular prèvia a la infecció i afavorir l'augment de la infectivitat. D'altra banda,

entre les anteriors referències no se'n troba cap, on s'incrementi el temps d'aturada tant com el present treball; cal recordar que Yuk i col. només el perllonguen fins a 3 h postinfecció [56]. Aquesta acció, de segur, augmenta la infectivitat en facilitar l'accés de l'adenovirus a l'interior de la cèl·lula.

A la Figura 5.28 es representen els perfils relacionats amb l'addició de medi fresc al llarg del cultiu i el volum total de medi alimentat, en relació amb el perfil de OUR en línia.

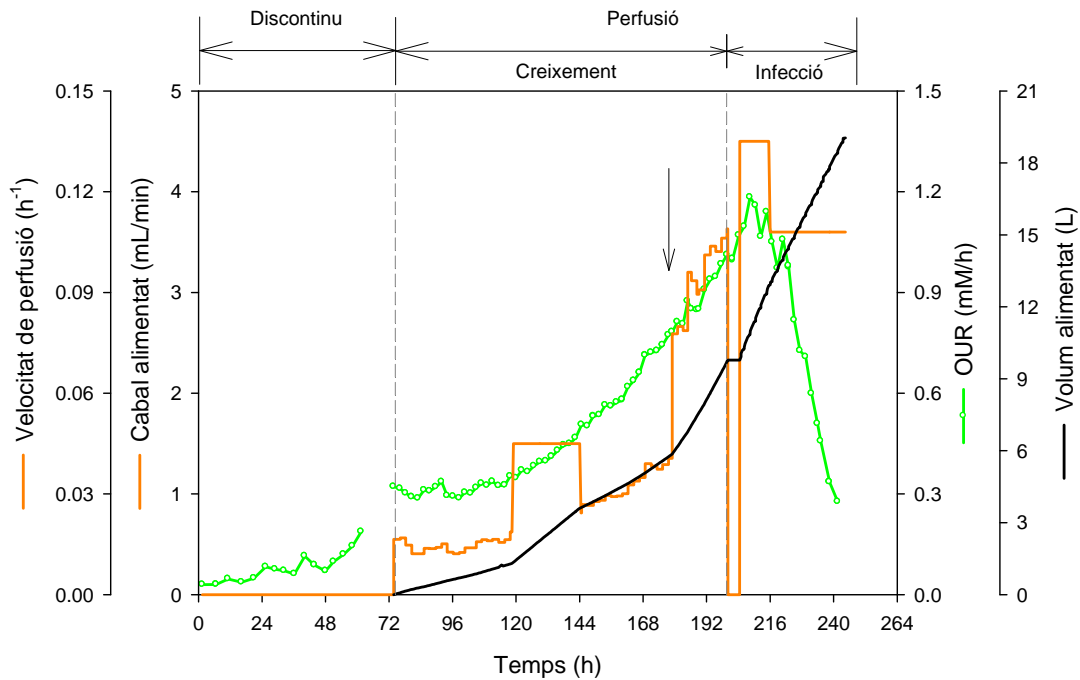


Figura 5.28. Perfils de cabal alimentat (—), de OUR (—), de velocitat de perfusió (—) i de volum alimentat (—) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment on la concentració residual de glucosa es modifica per començar el protocol d'infecció.

En el perfil d'addicions queda palès, l'augment de cabal efectuat de forma manual, entre les 120 h i 144 h per reactivar el cultiu, donat el baix creixement que s'observa al principi de la fase d'acumulació cel·lular descrit amb la Figura 5.26. Al llarg de la fase de creixement s'afegeix un total de 9,8 L de medi fresc al cultiu. També queda palès el començament del protocol d'infecció a les 179 h (21 h prèvies a la infecció), on la modificació de la concentració de glucosa a 14 mM, incrementa el cabal abruptament. A posteriori, es realitza l'aturada de l'alimentació i es procedeix a la recuperació del cultiu. El volum total alimentat durant tot el procés és de 19 L.

El cabal constant que s'alimenta durant el període postinfecció es calcula a partir de l'expressió en estat estacionari del balanç de matèria operant en perfusió aplicat a la glucosa:

$$Q_{add} = \frac{q_S \cdot X_V(t) V_R}{(Gluc_F - Gluc_{SP})}$$

Equació 5.23. Expressió per al càlcul del cabal addicionat durant el període postinfecció (Q_{add}), on: q_S és la velocitat específica de consum del substrat, V_R és el volum del reactor, $Gluc_F$ és la concentració de glucosa en el medi d'alimentació, $Gluc_{SP}$ és la concentració residual de glucosa en el bioreactor.

El principal inconvenient que presenta l'aplicació d'aquesta equació rau en conèixer la variació amb el temps de la concentració de cèl·lules viables ($X_V(t)$) durant el període d'infecció, donat que el creixement exponencial ja no es dona. Com a simplificació i en base als resultats obtinguts en l'anterior perfusió amb infecció, es considera que aquesta variable pren un valor mitjà i constant de $80 \cdot 10^5$ cell/mL. La resta de dades es consideren també constants: el consum específic de glucosa durant la infecció es pren igual a $270 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cell} \cdot \text{h})$, valor provinent del procés en discontinu (veure Taula 5.6); el volum del bioreactor és de 2 L, la concentració de glucosa a l'aliment és de 25 mM i dins del bioreactor es vol una concentració residual de 5 mM. El valor resultant del cabal de recuperació és de 3,6 mL/min.

De totes maneres, es decideix que aquest no s'aplica de forma constant, sinó que durant les primeres 12 h postinfecció, per recuperar el més ràpid possible el cultiu, s'alimenta amb un 25% més (4,5 mL/min) i, finalment, es deixa el seu valor definitiu fins al final de l'experiment.

Finalment, el perfil de metabòlits, mostrat a la Figura 5.29, reflexa clarament les accions preses sobre el cabal de perfusió.

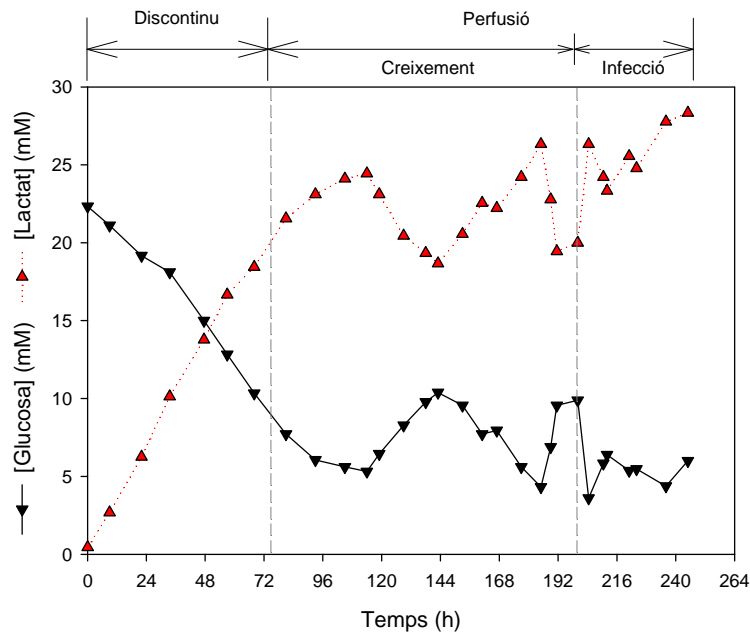


Figura 5.29. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor convencional amb medi 293 SFMII.

Els perfils durant la fase de creixement resulten més erràtics que en anteriors cultius (veure Figura 5.21 i Figura 5.25). Tendeixen a estabilitzar-se al voltant del valor consigna de glucosa, però a partir de les 120 h oscil·len com a conseqüència de l'addició manual; la glucosa assolix una concentració màxima de 10,4 mM i el lactat de 18,7 mM a les 144 h, a partir de les quals es recuperen els valors previs a l'addició. El moment en què això s'aconsegueix, coincideix amb l'activació del protocol d'infecció, amb una concentració de glucosa 10 mM, assolida prèviament a l'aturada, la qual davalla fins a 3,5 mM en finalitzar-la.

El protocol d'addició amb cabal constant compleix amb el seu objectiu, doncs atura la caiguda de glucosa i la producció de lactat i aconsegueix mantenir la concentració de la primera al voltant del seu valor consigna fins al final de l'experiment.

5.4.3.3. Determinació dels paràmetres cinètics i estequiomètrics.

Per extrapolar els càlculs desenvolupats a l'apartat 5.4.2.3 a l'estratègia de producció en continu amb perfusió, cal partir, de manera anàloga, de les equacions de balanç aplicades a cadascun dels components.

En aquest cas, les equacions foren desenvolupades per primera vegada per Seamans i Hu per modelitzar cultius d'hibridomes en continu amb perfusió [77]:

$$V_R \cdot \frac{dX_V}{dt} = (\mu - \mu_d) X_V \cdot V_R - (1 - \beta) Q_{add} \cdot X_V$$

Equació 5.24. Balanç de matèria aplicat a les cèl·lules viables per a un bioreactor de tanc agitat operant en perfusió, on: X_V és la concentració de cèl·lules viables, t és el temps, V_R és el volum del reactor, μ és la velocitat específica de creixement, μ_d és la velocitat específica de mort, β és el coeficient de retenció, Q_{add} és el cabal d'alimentació.

$$V_R \cdot \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X_V \cdot V_R + Q_{add} \cdot (S_F - S)$$

Equació 5.25. Balanç de matèria aplicat al substrat per a un bioreactor de tanc agitat operant en perfusió, on: S és la concentració de substrat, S_F és la concentració de substrat a l'aliment, q_s és la velocitat específica de consum del substrat.

$$V_R \cdot \frac{dP}{dt} = q_p \cdot X_V \cdot V_R - Q_{add} \cdot P$$

Equació 5.26. Balanç de matèria aplicat al producte per a un bioreactor de tanc agitat operant en perfusió, on: P és la concentració de producte, q_p és la velocitat específica d'obtenció del producte.

Mentre que les relacions estequiomètriques entre metabòlits se segueixen determinant a partir de l'Equació 5.16, la manipulació matemàtica dels anteriors balanços per obtenir expressions aplicables a les dades obtingudes fora de línia (n) és de caire lleugerament més complex que la realitzada en la producció en discontinu. El resultat final és la següent:

- Per realitzar l'estimació de la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$), es considera que la retenció del filtre és total, és a dir, la concentració de cèl·lules viables al corrent de filtrat que l'abandona és zero; de manera que el coeficient de retenció (β) pren un valor unitari. Per tant, el càlcul del paràmetre no varia i es continua realitzant amb l'Equació 5.9.
- Per fer l'estimació dels paràmetres específics de consum o producció (q_s i q_p), es discretitzen l'Equació 5.25 i l'Equació 5.26, i s'expressen en forma d'increments acumulats en funció de la integral de cèl·lules viables per obtenir les següents igualtats, en funció del nombre de dades (n) obtingudes fora de línia:

$$a) \sum_n \Delta S = \sum_n \left[\frac{Q_{add}}{V_R} \cdot (S_F - S) \Delta t \right] - q_S \cdot ICV \quad ; \quad b) \sum_n \Delta P = q_P \cdot ICV - \sum_n \left[\frac{Q_{add}}{V_R} \cdot P \cdot \Delta t \right]$$

Equació 5.27. Balanços de matèria discretitzats aplicat a un bioreactor de tanc agitat operant en continu amb perfusió: a) substrat; b) producte.

El càlcul de la integral de cèl·lules viables es realitza de forma anàloga a l'Equació 5.15. En canvi, la determinació del consum acumulat de nutrients ($\Sigma \Delta S$) i de la producció acumulada de subproductes ($\Sigma \Delta P$) té les següents expressions finals:

$$a) \sum_{i=1}^{n-1} \Delta S_i = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{Q_{add,i}}{V_R} (S_F - \bar{S}_i) \cdot (t_i - t_{i-1}) - (S_i - S_{i-1}) \right] \quad ; \quad \bar{S}_i = \frac{S_i + S_{i-1}}{2}$$

$$b) \sum_{i=1}^{n-1} \Delta P_i = \sum_{i=1}^{n-1} \left[(P_i - P_{i-1}) + \frac{Q_{add,i}}{V_R} \bar{P}_i \cdot (t_i - t_{i-1}) \right] \quad ; \quad \bar{P}_i = \frac{P_i + P_{i-1}}{2}$$

Equació 5.28. Expressions per calcular els paràmetres acumulats en perfusió, on: a) substrat, \bar{S}_i és la mitjana de concentració de substrat a l'interval de temps (t_i, t_{i-1}); b) producte, \bar{P}_i és la mitjana de concentració de producte a l'interval de temps (t_i, t_{i-1}).

La totalitat dels paràmetres calculats per als tres cultius que integren la producció en continu amb perfusió es recullen a la Taula 5.11, juntament amb algunes dades útils per a la seva comparació. No obstant, davant dels problemes en el perfil d'addició de nutrients descrits a la primera perfusió amb infecció ("Infecció 1"), no es calculen els seus consums d'infecció.

En general, els valors cinètics obtinguts estan d'acord amb els publicats a la bibliografia per diversos autors com Henry i col. i Xie i col. [43, 55].

Si s'observen els cultius de forma independent, a grans trets, la "Infecció 1" presenta les pitjors dades cinètiques, la qual cosa es relaciona amb la seva major duració en comparació amb els altres dos cultius, tot i que el de referència es troba sense infectar. Mencionada aquesta diferència concreta, existeixen diversos aspectes que cal que siguin comentats de forma genèrica, doncs afecten tots tres cultius de la mateixa forma.

Primerament, cal fer referència a la disminució de la velocitat específica de creixement que suposa el pas de l'etapa *batch* a l'etapa en perfusió, degut principalment i com s'ha comentat, als efectes del sistema de filtració externa i al sistema d'aeració intensiva. Aquest estrès addicional, al que són sotmeses les cèl·lules, també fa augmentar les velocitats específiques relacionades amb els metabòlits; malgrat tot, l'estratègia en perfusió minimitza la producció de subproductes com el lactat, ja que el rendiment lactat/glucosa ($Y_{Lac/Gluc}$) decreix en aquest període.

Paràmetre cinètic	Producció en continu amb perfusió							
	Referència		Infecció 1			Infecció 2		
	Discontínu	Creixement	Discontínu	Creixement	Infecció	Discontínu	Creixement	Infecció
Durada (h)	262		312			245		
X_{v,0} (10⁶ cell/mL)	0,27	-	0,22	-	-	0,42	-	-
μ_{màx} (h⁻¹)	0,0221	0,0148	0,0241	0,0148	-	0,0307	0,0156	-
t_{dupl} (h)	31	47	29	47	-	23	44	-
q_{Gluc} (nmol/(10⁶ cell·h))	160	210	100	170	-	190	200	300
q_{Lac} (nmol/(10⁶ cell·h))	220	290	140	180	-	320	250	390
q_{O2} (nmol/(10⁶ cell·h))	160	240	110	140	160	100	115	120
Y_{Lac/Gluc} (mmol/mmol)	1,37	1,16	1,4	1,06	-	1,68	1,25	1,3
Y_{O2/Gluc} (mmol/mmol)	1	1,04	1,2	1,06	-	0,52	0,61	0,4
X_{v,màx}* (10⁶ cell/mL)	-	10,8	-	-	9,5	-	-	8,7
OUR_{màx}* (mM/h)	-	1,9	-	-	1,5	-	-	1,2
Vel_{perf}[§] (vol/dia)	-	1,0	-	0,8	1,5	-	1,0	2,4

Taula 5.11. Paràmetres cinètics en el sistema convencional operant en continu amb perfusió. * El valor màxim s'informa a la fase on es dona; [§] Valor mitjà; [♦] 1 vol = 2 L.

D'altra banda, encara que només es disposen dades d'infecció per a un dels cultius, s'observa que, al igual que en la producció en discontinu, a la fase d'infecció es dona un augment de totes les velocitats específiques calculades respecte el seu valor original en la fase de creixement; no obstant, l'increment és aproximadament d'un 50%, en comptes del 30% anterior, excepte per al q_{O_2} que només ho fa un 5%. Aquest fet pot tenir relació amb l'augment dels títols finals obtinguts, així com de la productivitat específica cel·lular. És a dir, el potencial de la cèl·lula per crear nous virions s'aprofita més en perfusió, però això exigeix un esforç addicional per la seva part.

5.5. Sistema no convencional

Fins fa aproximadament deu anys, els bioreactors de tanc agitat han estat majoritàriament emprats en l'etapa de producció de qualsevol procés biotecnològic. Tanmateix, aquests presenten una sèrie d'inconvenients inherents al seu disseny que afecten negativament el cultiu cel·lular i, en conseqüència, la productivitat vírica. Entre aquests, cal destacar l'esmentat estrès tallant que han de suportar les cèl·lules degut a l'agitació mecànica i a l'aeració per bombolleg. D'altra banda, la reutilització del bioreactor obliga a intenses operacions de rentat i esterilització que afecten el cost d'inversió resultant degut a la instal·lació d'equips auxiliars de rentat i esterilització *in situ* (CIP i SIP). Si el procés ha de complir addicionalment amb la normativa GMP, ja que se n'obté un producte destinat a teràpia humana, com és el cas dels vectors adenovirals, la validació requerida per a aquests processos pot portar mesos, tot augmentant la dificultat operacional i els costos globals dels mateixos.

Com ja s'ha comentat a la introducció, les tecnologies de bioprocés d'un sol ús faciliten i simplifiquen l'adaptació del bioprocés a la normativa GMP. Per tant, resulta interessant l'avaluació d'aquestes en l'etapa de producció amb la utilització dels anomenats sistemes no convencionals, de la mateixa manera que ho ha estat el bioreactor convencional de tanc agitat per tal de comparar els principals paràmetres.

Dels dos grans grups de bioreactors no convencionals disponibles en l'actualitat: aquells amb agitació sense element mecànic al seu interior i els que mantenen el concepte de "tanc agitat", en el present treball s'ha pogut disposar d'un dels primers sistemes introduïts en el mercat i més àmpliament utilitzat, el *Wave Bioreactor* de GE Healthcare (veure Figura 5.30).

A grans trets, aquest bioreactor consisteix en una cambra de cultiu cel·lular (*cellbag*), en forma de bossa preesterilitzada de plàstic flexible, la qual s'omple parcialment amb el medi de cultiu i s'inocula amb les cèl·lules; la resta del volum de la cambra queda ocupat per una atmosfera de gas que manté la bossa inflada en tot moment, i amb una composició controlada mitjançant l'entrada i sortida d'un cabal de gas filtrat. La *cellbag* es disposa sobre una plataforma que proporciona un moviment d'agitació per balanceig cap a endavant i endarrere ajustable en velocitat i angle; aquest es tradueix en la generació d'ones a la superfície del

líquid que proporcionen, d'una banda, l'aeració imprescindible, lliure de bombolles i no limitada només a l'àrea superficial de transferència gas-líquid i, d'altra banda, el grau de mescla necessari per evitar gradients al si del fluid i mantenir la suspensió cel·lular de forma homogènia [84].

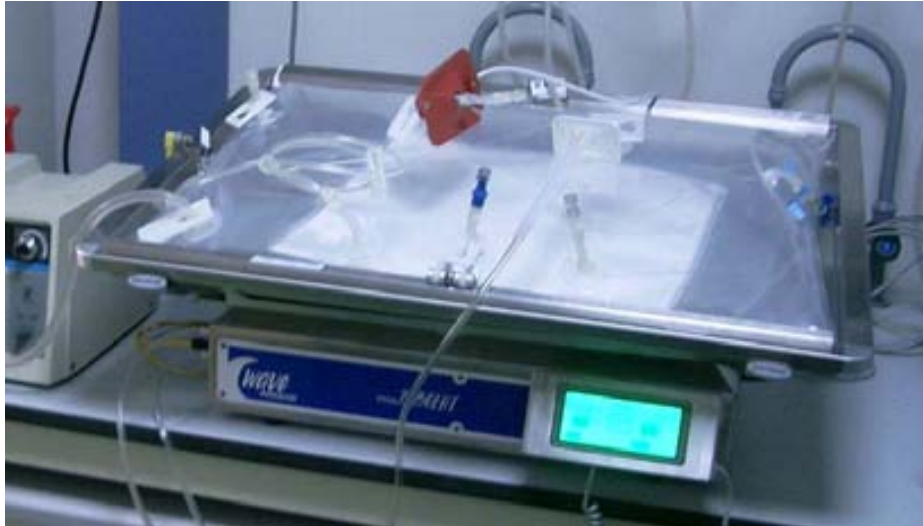


Figura 5.30. Bioreactor no convencional *Wave Bioreactor* (GE Healthcare).

A la Figura 5.31, es mostra un diagrama amb el principi de funcionament del sistema de producció no convencional *Wave Bioreactor*.

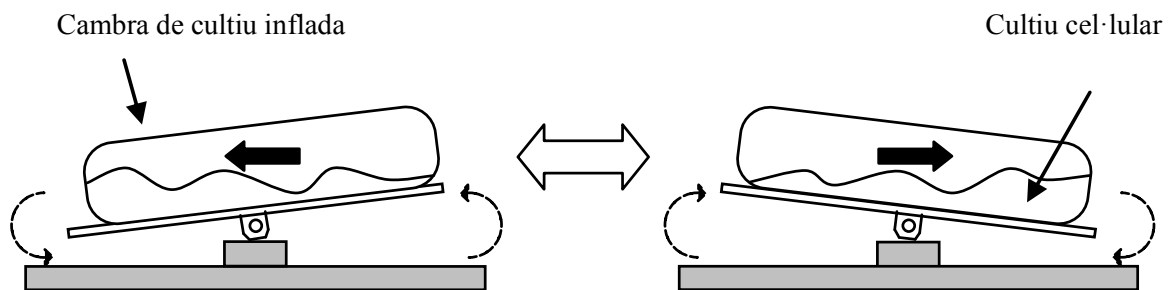


Figura 5.31. Principi de funcionament basat en la generació de ones del sistema de producció no convencional (*Wave Bioreactor*) [85].

Existeix un tercer element que integra aquest sistema de producció que consisteix en les unitats de mesura i control, les quals es connecten a la bossa per tal d'efectuar la mescla de gasos (principalment CO_2 per al control de pH, i oxigen) i el monitoratge de la concentració d'oxigen dissolt. Aquest últim es realitza a través d'un sensor òptic amb un temps de resposta ràpid ($t_{90\%} < 10 \text{ s}$), menor que el del sensor polarogràfic tradicional emprat en els bioreactors convencionals; la seva configuració permet la introducció a la bossa sense comprometre l'esterilitat, ja que va inclòs a l'interior d'una funda permeable només als gasos (veure apartat 9.5.2.2 del capítol de materials i mètodes).

La comercialització d'aquest bioreactor va començar l'any 1999 amb unitats que poden abastar un volum nominal (total) de 1000 L. Tanmateix, una mateixa cambra de cultiu

proporciona molta flexibilitat operacional, ja que permet contenir un rang variable de volums de líquid. Aquest rang es troba delimitat, d'una banda, per un volum útil, com a màxim, del 50% del volum nominal i, d'altra banda, pel mínim necessari com perquè les sondes entrin en contacte amb el medi.

En aquest sentit, el rang operacional que oscil·la des de 1 L fins a 10 L resulta força interessant, ja que no només permet continuar amb el desenvolupament del procés, sinó que a la vegada permet afrontar una escala productiva pilot per estudiar possibles efectes de canvi d'escala. La cambra de cultiu Cellbag-20L s'adapta perfectament al rang de volum esmentat i és per aquesta raó que s'escull per continuar amb el procés de producció de vectors adenovirals.

La capacitat del sistema d'aeració superficial del *Wave Bioreactor* per aportar oxigen des de la fase gas fins al sí del medi líquid s'avalua, novament, gràcies a la determinació del coeficient volumètric de transferència d'oxigen (k_{La}), i a la posterior comparació amb els valors en el sistema convencional. La comercialització d'aquest bioreactor permet disposar d'estudis previs de determinació del k_{La} [86]. Aquests indiquen un comportament inversament proporcional entre el k_{La} i el volum de líquid present a l'interior de la bossa, de manera que aquest últim es fixa al valor màxim de 10 L que pot contenir la *cellbag* per avaluar els valors del coeficient més desfavorables. D'altra banda, el cabal d'aeració subministrat per mantenir la bossa rígida no té cap efecte significatiu en el coeficient, ja que el rang de cabals d'aeració emprat, entre 0,01 vvm i 0,1 vvm (entre 0,1 L/min i 1 L/min de cabal de gas per volum de bioreactor de 10 L), aconsegueix una renovació important de l'atmosfera a l'interior de la bossa, però només augmenta lleugerament la pressió sobre la superfície del líquid [86, 87].

A la Figura 5.32, es mostren els perfils de k_{La} en funció de l'angle i la velocitat d'agitació per balanceig emprant la Cellbag-20L omplerta amb 10 L d'aigua, realitzats a una temperatura de 37 °C i un cabal d'aeració constant dins dels marges establerts. Cal esmentar que el medi de cultiu sense sèrum pot presentar un comportament reològic diferent a l'aigua, però mai no serà tan substancial com per no poder extrapolar els valors obtinguts de k_{La} com a vàlids.

Com es pot apreciar, existeix una forta dependència del coeficient respecte la velocitat d'agitació, encara que en augmentar l'angle a partir de 7°, els valors del coeficient són molt similars. Les dades, sobretot per a la corba de 10°, s'assimilen a les publicades per Knevelman i col. [87]. Com es veurà en els següents apartats i seguint les recomanacions del fabricant, les condicions d'operació habituals es troben en una agitació entre 20 rpm i 30 rpm, i un angle de balanceig entre 7° i 10°; amb aquestes condicions el valor mitjà del k_{La} en el sistema es troba al voltant de 20 h⁻¹. Aquest valor és comparable als obtinguts en el bioreactor convencional (entre 10 h⁻¹ i 20 h⁻¹), tal i com s'indica a l'apartat 5.4.3.2.

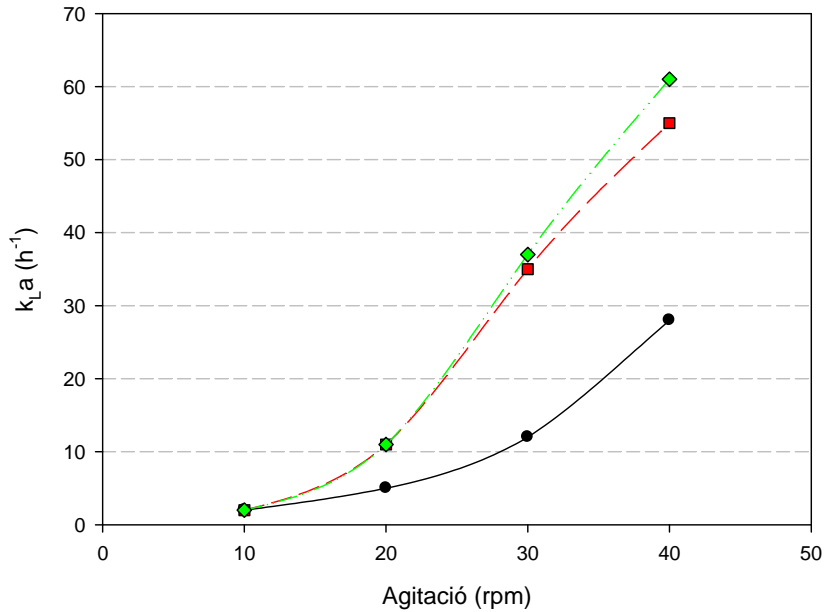


Figura 5.32. Perfils del coeficient volumètric de transferència d'oxigen ($k_{L,a}$) per al sistema de producció no convencional (*Wave Bioreactor*) utilitzant una Cellbag-20L amb un volum de 10 L d'aigua i operant a una temperatura de 37°C: angle de 3°(●); angle de 7° (■); angle de 10°(◆) [86].

Es pren que, com a mínim, el valor de consigna per a l'oxigen dissolt equivaldrà al fixat en la producció en el sistema de producció convencional del 50% ($C_{O_2} = 0,5 \cdot C_{O_2}^*$); s'assumeix que per a medis de cultiu cel·lular a 37 °C, la concentració de saturació ($C_{O_2}^*$) amb aire ha estat calculada per alguns autors, essent el seu valor constant i igual a 0,194 mM [79-81] i, finalment, que la velocitat de consum específic d'oxigen (q_{O_2}) en la fase de creixement és de 125 nmol/(10⁶ cell·h). Substituint aquestes dades i el valor del $k_{L,a}$ a l'Equació 5.22, s'obté que el *Wave Bioreactor* podria arribar a suportar una densitat cel·lular màxima de fins a 155·10⁵ cell/mL. Aquest valor, encara que per sobre del màxim determinat en el cas convencional, s'haurà de comprovar amb les dades empíriques extretes dels següents experiments de cultiu, sobretot en el cas de la producció en continu amb perfusió, estratègia on s'obté una major densitat cel·lular.

El monitoratge en línia del cultiu basat en la velocitat de consum d'oxigen (OUR) no es podrà implementar en aquest sistema, en previsió d'una sèrie de problemes per aplicar la tècnica dinàmica de mesures en la fase líquida, inherents al disseny del bioreactor.

Com s'ha comentat, la mesura de la OUR amb la tècnica dinàmica es basa en aplicar un balanç de matèria sobre el perfil de davallada d'oxigen dissolt entre dos límits (veure Equació 5.1). Aquesta caiguda és deguda únicament a dues causes: el consum d'oxigen per part de les cèl·lules i la desorció d'aquest des de la fase líquida fins a la gas. L'èxit d'aplicació de la tècnica rau, doncs, en el predomini del terme de consum cel·lular respecte el terme de desorció. Per tant, partint de la premissa que la velocitat per transferir oxigen en el *Wave Bioreactor*, representada pel $k_{L,a}$, és superior a la velocitat de consum de les cèl·lules, ja que

altrament aquest bioreactor no seria apte per al cultiu; si es demostra que la velocitat de desorció, representada per la K_{des} , és, com a mínim, del mateix ordre que el $k_{L,a}$, el mètode per mesurar la OUR quedaria descartat.

De fet, degut a que el seu sistema d'aeració superficial no és independent al d'agitació, els mètodes per determinar tots dos coeficients comparteixen el mateix principi d'operació, és a dir, es calculen a partir de dades del mateix fenomen de transferència de l'oxigen, però en diferents períodes: en el cas de la K_{des} és la desorció i en el cas del $k_{L,a}$ és l'absorció. D'acord amb Figura 5.32, es podria suposar que les velocitats de desorció i transferència (absorció) haurien de ser molt similars i elevades, de manera que l'oxigen tendiria a desabsorbir més ràpidament que no pas a ésser consumit per les cèl·lules. Com a conclusió, es reduiria la importància relativa del terme de consum cel·lular respecte el terme de desorció en la mesura de la OUR, la qual cosa dificultaria molt el monitoratge de l'activitat cel·lular a través de la tècnica dinàmica desenvolupada fins al moment.

Per corroborar aquesta hipòtesi, es decideix portar a terme un experiment amb l'objectiu determinar totes dues constants en el sistema no convencional a una temperatura de 37 °C. Per facilitar la manipulació de la cambra de cultiu, s'utilitza una Cellbag-2L omplerta amb 1 L d'aigua, en comptes de la Cellbag-20L omplerta amb 10 L. Ambdues bosses comparteixen el mateix disseny, de manera que les conclusions extretes es consideraran extrapolables i independents del volum. A la Figura 5.33, es mostren els resultats obtinguts.

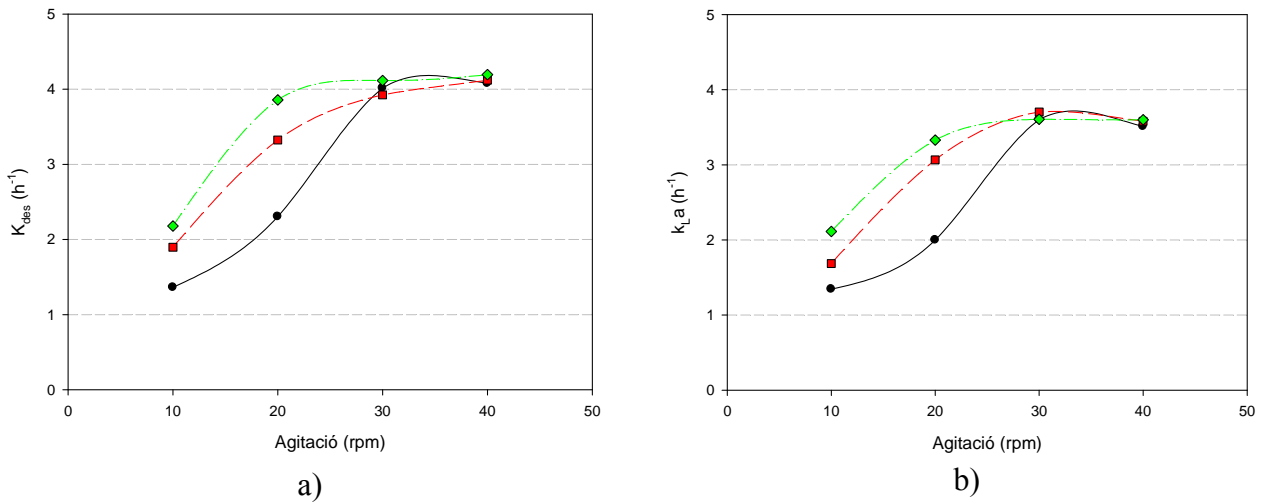


Figura 5.33. Perfils de la constant K_{des} (a) i del coeficient $k_{L,a}$ (b) per al sistema de producció no convencional (*Wave Bioreactor*) utilitzant una Cellbag-2L amb un volum de 1 L d'aigua i operant a una temperatura de 37°C: angle de 5° (●); angle de 7° (■); angle de 9° (◆).

Com es pot observar, ambdues representacions segueixen els comportaments descrits a la Figura 5.32: augment del valor del coeficient a mesura que s'incrementa l'agitació i l'angle. Tanmateix, destaca l'estabilització dels valors màxims a partir de 30 rpm, independentment de l'angle; en el cas de la K_{des} al voltant de 4,2 h⁻¹, i en el cas del $k_{L,a}$ al voltant de 3,6 h⁻¹. Les màximes velocitats de desorció i absorció d'oxigen en aquesta bossa en particular demostren que el fenomen de desorció, no només iguala el fenomen d'absorció de l'oxigen, sinó que el

supera lleugerament.

En canvi, en el cas del bioreactor convencional, el disseny de la cuba fa que el fenomen de desorció només es pugui produir en la reduïda superfície del fluid, en comparació amb tota l'àrea del no convencional (veure Figura 5.34). Aquest fet queda reflectit per la baixa constant de desorció (K_{des}) del sistema, la qual es troba entre $0,4 \text{ h}^{-1}$ i $0,5 \text{ h}^{-1}$.

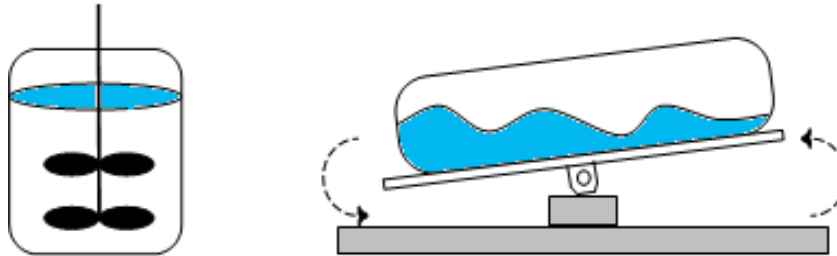


Figura 5.34. Esquema per comparar les àrees de líquid on es pot donar el fenomen de desorció (color blau) per al bioreactor convencional i no convencional.

A mode de resum, la Taula 5.12 mostra els valors dels coeficients $k_{L,a}$ i K_{des} en ambdós bioreactors. Els valors posen de manifest el diferent ordre de magnitud de les dues constants en el sistema convencional de 2 L, on és possible independitzar l'aeració de l'agitació; mentre que en el sistema no convencional operant amb 1 L s'observa la similitud de les mateixes.

Sistema de producció	Volum (L)	$K_{des} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_{L,a} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Convencional	2	0,4 – 0,5	10 – 20*
No convencional	1	1,3 – 4,2	1,3 – 3,6

Taula 5.12. Valors de la constant de desorció (K_{des}) i del coeficient volumètric de transferència d'oxigen ($k_{L,a}$) per al sistemes de producció. * Valors procedents de Gámez [34].

Com a alternativa per poder continuar aplicant la mesura de OUR, seria necessari avaluar els mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen a la fase gas descartats prèviament, encara que impliquin uns equips més cars i siguin més complicats d'implementar en processos productius.

L'eliminació de la mesura de la OUR, juntament amb la bona capacitat de transferència del bioreactor no convencional fan que sigui possible l'eliminació del control d'oxigen dissolt, la qual cosa simplifica la complexitat operacional de la unitat, tot augmentant la seva robustesa. El monitoratge *on line* de l'evolució lliure de l'oxigen dissolt (pO_2) al llarg del cultiu no proporciona tanta informació sobre l'estat fisiològic de les cèl·lules, però esdevé una alternativa per observar i indicar possibles problemes [33]. D'altra banda, la bona aeració superficial esmentada i el subministrament continuat en el cabal de gas d'un percentatge de CO_2 constant també permeten, gràcies a l'efecte tamponador del medi de cultiu, l'estalvi addicional del control de pH. Així s'evita l'addició de solucions correctores (bàsiques o àcides) que augmenten l'osmolaritat del medi de cultiu i perjudiquen el creixement cel·lular.

Dins d'aquest context, és possible prescindir d'un programari de control de procés similar al

MFCS/win 3.0 utilitzat prèviament. L'execució d'un programari de monitoratge i representació de dades serà suficient.

5.5.1. Producció en discontinu

5.5.1.1. Descripció de la producció en discontinu

Per portar a terme els experiments es disposa de la base o plataforma d'agitació per balanceig *System20/50EHT* (GE Healthcare), descrita a l'apartat 9.5.2.1 del capítol de materials i mètodes, la qual permet treballar en un rang de volums operacionals que abraça des de 0,1 L fins a 25 L, en funció de la cambra de cultiu que s'utilitzi. La unitat incorpora el control de temperatura a través de l'escalfament de la superfície de balanceig, en contacte continu amb la *cellbag*, i incorpora un compressor per introduir-hi el cabal d'aeració.

Com s'ha esmentat, entre les possibles alternatives de cambra de cultiu a emprar sobre la plataforma (veure www.wavebiotech.com), totes elles fabricades en polietilè de baixa densitat emprat per a l'emmagatzematge de mostres sanguínies i el transport de fluids biològics, la *Cellbag-20L* és el tipus que s'ajusta al rang de volums d'operació seleccionat (entre 1 L i 10 L). Al contrari del que hom pugui pensar, aquesta bossa de cultiu constitueix un element molt versàtil i amb múltiples configuracions, les quals es basen en el nombre, distribució i funció dels ports que incorpora, i que afavoreixen la interacció amb el cultiu sense comprometre la seva esterilitat (veure apartat 9.5.2.2 del capítol de materials i mètodes). En concret, per portar a terme els experiments en discontinu, s'utilitza la cambra de cultiu *Cellbag-20L (pH version)*, la qual es caracteritza principalment per disposar d'una sonda de pH preinstal·lada.

La disposició en discontinu dels elements descrits, a la qual s'incorporen les unitats de mesura (oxigen dissolt i pH) i les estacions de mescla de gasos (CO_2 i oxigen), es mostra a la Figura 5.35 i a l'esquema de la Figura 5.36.

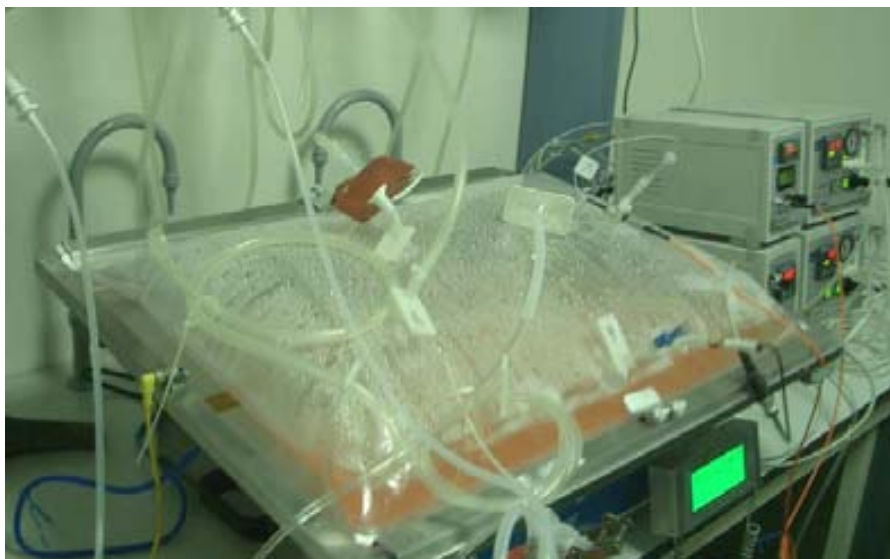


Figura 5.35. Sistema no convencional (*Wave Bioreactor*): muntatge experimental operant en discontinu.

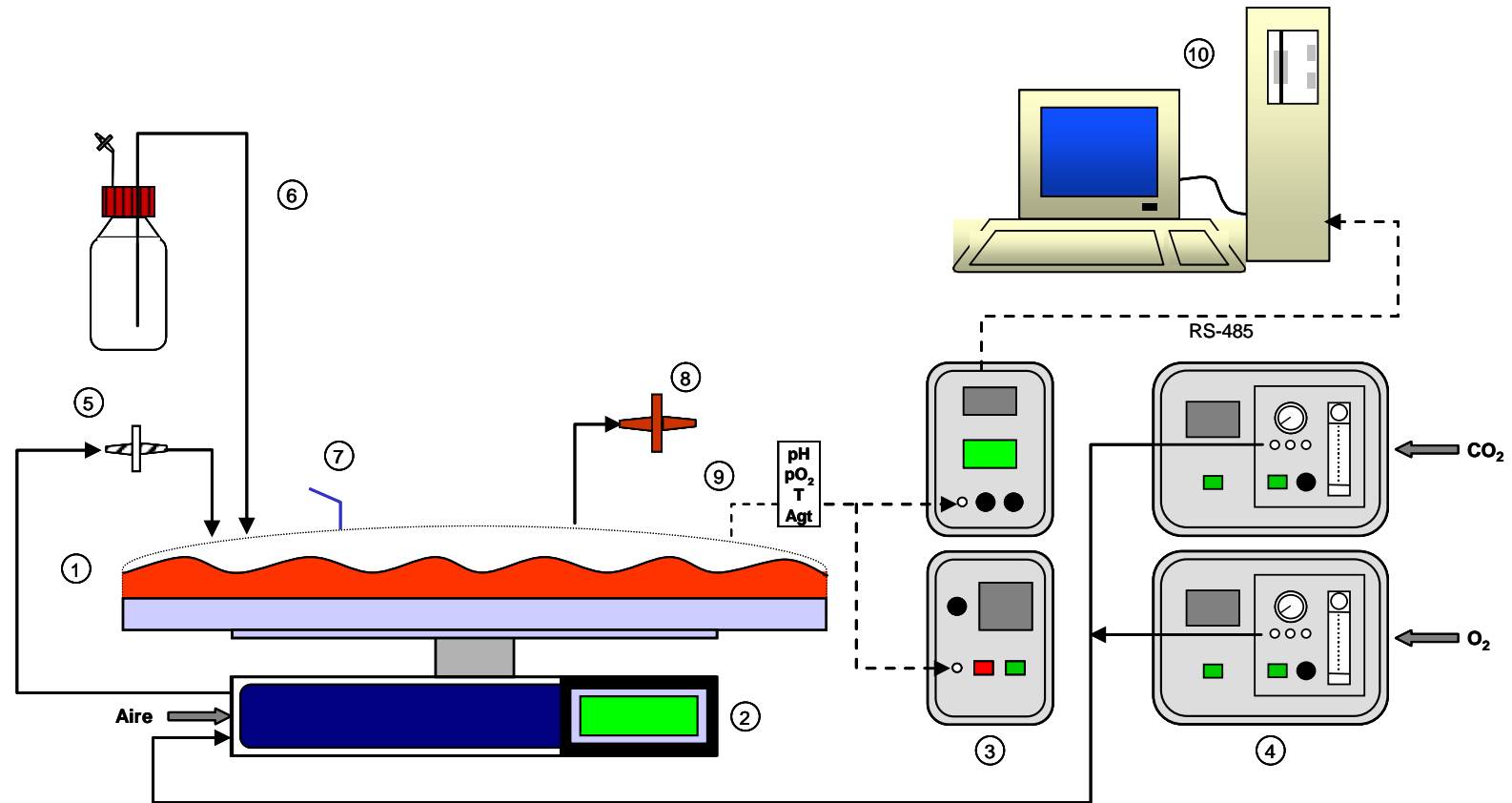


Figura 5.36. Sistema no convencional: esquema del muntatge experimental operant en discontinu. 1) Cambra de cultiu (10 L); 2) Plataforma d'agitació per balanceig; 3) Unitats de mesura de pH i pO₂; 4) Estacions de mescla de gasos; 5) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 6) Circuit d'inoculació; 7) Presa de mostra manual; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Sondes de temperatura, pH i pO₂; 10) Ordinador de gestió i control.

Un element del muntatge experimental a destacar és l'escalfador que envolta el filtre de gasos de sortida, el qual actua com una manta tèrmica per evitar la seva colmatació, degut a la condensació d'humitat en produir-se el descens de temperatura sobtat entre el cultiu i l'entorn dels gasos de sortida.

Inicialment, es procedeix a omplir la bossa amb el medi de cultiu, i s'activa el cabal d'aeració amb la mescla de gasos per facilitar l'estabilització del pH. S'activen els controls d'agitació i de temperatura, i s'executa el protocol de comunicació amb l'ordinador de gestió per monitorar i emmagatzemar les dades del procés productiu. En el moment que els valors són estables, es procedeix a la inoculació.

5.5.1.2. Caracterització de la producció en discontinu

De forma anàloga al sistema convencional de producció, l'estratègia en discontinu serveix per establir el comportament de la línia cel·lular i determinar, així, la concentració d'infecció, la qual pot diferenciar-se de la fixada anteriorment en $10 \cdot 10^5$ cell/mL.

El resultat del cultiu obtingut amb el sistema no convencional de producció operant en discontinu sense infecció es presenta a la Figura 5.37. Aquest es realitza en medi 293 SFMII, suplementat amb 4 mM de glutamina i 50 ppm d'antiescumejant C.

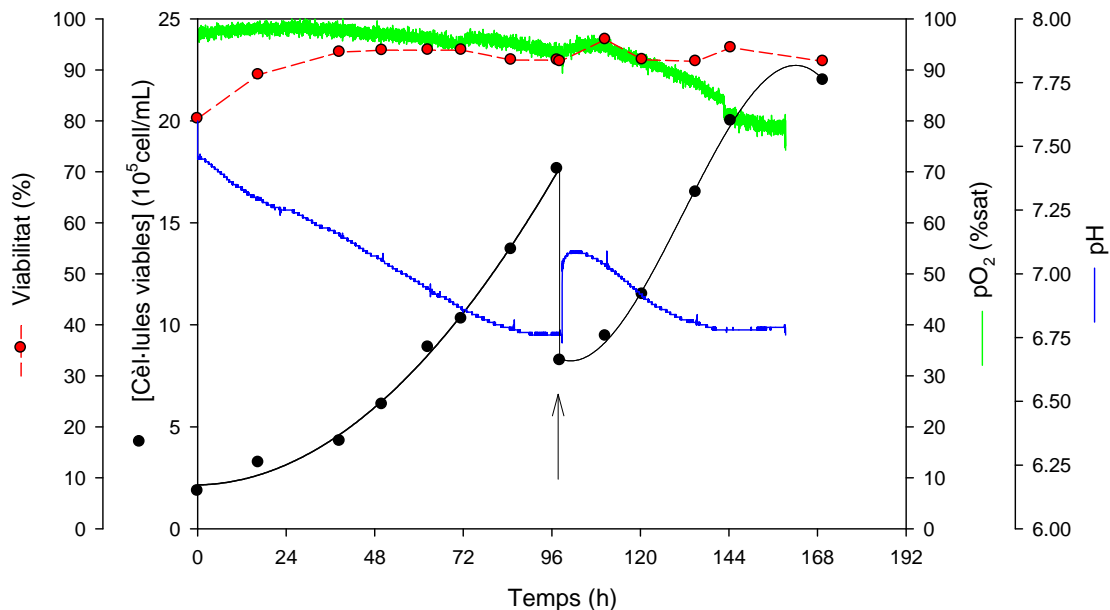


Figura 5.37. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de pO₂ (—) i de viabilitat cel·lular (■) en un cultiu en discontinu en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

L'únic paràmetre de control, com a tal, que es conserva respecte el bioreactor de tanc agitat és la temperatura de 37 °C. De fet, el nou sistema de producció no convencional implica l'aparició de noves variables de control, les quals es mantenen al llarg del cultiu en les següents consignes: velocitat i angle de balanceig de 20 rpm i 7° respectivament, d'acord amb les recomanacions del fabricant. Com s'ha comentat a l'apartat 5.5, a diferència del sistema convencional, el cultiu es realitza sense control d'oxigen dissolt (pO₂). L'aportació d'oxigen

s'efectua amb un cabal d'aeració constant de 200 mL/min, íntegrament format per aire; si les cèl·lules ho requereixen, aquest pot ésser enriquit amb oxigen. Així mateix, tampoc no s'utilitza control de pH; no obstant, s'addiciona una concentració constant de CO₂ dissolt (pCO₂) del 8% al cabal d'aeració subministrat, seguint les recomanacions del fabricant del medi de cultiu. Malgrat tot, les dades d'evolució lliure tant del pO₂ com del pH es monitoren per corroborar si les condicions d'operació són correctes i poden indicar situacions no desitjades (limitació d'oxigen, possibles contaminacions, etc...).

L'aspecte més destacable del cultiu és la forma característica del perfil de cèl·lules viables, amb dos trams de creixement ben diferenciats, a partir de les 97 h. Aquest fet és degut al volum relativament elevat de 10 L que disposa la bossa de cultiu i a la seva capacitat per simplificar la propagació de l'inòcul. És a dir, en comptes de començar l'experiment directament a volum final, la qual cosa requereix un llarg procés d'escalat per aconseguir el nombre de cèl·lules suficient en equips de menor volum (per exemple, flascons agitats), es decideix portar-lo a terme a l'interior de la mateixa cambra de cultiu, partint d'un volum inferior [84]. Això permet operar amb una única bossa de cultiu, reduint el nombre d'equips de menor volum i de transvasaments entre unitats, juntament amb els consegüents riscos de contaminació que comporten. Com a contrapartida, la duració del procés augmenta fins a les 168 h abans d'assolir la fase estacionària, 72 h més que el sistema convencional (veure Figura 5.11).

Així, aquest experiment s'inocula amb una concentració inicial de $2 \cdot 10^5$ cell/mL en un volum inicial de 4 L. Amb l'objectiu de minimitzar el nombre de manipulacions durant el discontinu, es decideix realitzar una única addició dels 6 L restants de medi fresc. Per tant, cal decidir el moment per portar-la a terme, abans que el cultiu accedeixi a la seva fase estacionària. La manca de la mesura d'activitat cel·lular deixa la concentració cel·lular assolida en la fase exponencial de l'anterior estratègia en discontinu (veure Figura 1.11), situada al voltant de $10 \cdot 10^5$ cell/mL i $12 \cdot 10^5$ cell/mL, com a principal guia, juntament amb la concentració residual de glucosa en aquest instant, per tal d'assegurar que el cultiu no es troba en condicions limitants. De manera que, l'addició es decideix realitzar a les 97 h de cultiu amb una densitat cel·lular de $18 \cdot 10^5$ cell/mL, quan la concentració residual de glucosa encara és de 10 mM. L'efecte de dilució provocat fa que el segon tram de creixement comenci amb una concentració de $8 \cdot 10^5$ cell/mL i assoleixi un màxim de concentració de $22 \cdot 10^5$ cell/mL a les 168 h, on comença la fase estacionària de creixement. Aparentment, existeix una densitat cel·lular màxima en aquest cultiu, major que l'assolida en el sistema convencional ($12 \cdot 10^5$ cell/mL); però cal recordar que aquell primer cultiu de referència parteix d'una concentració de nutrients inferior (veure Figura 5.12), la qual podria haver afectar la densitat cel·lular màxima assolida, tot disminuint-la.

Durant tot aquest període, la viabilitat cel·lular es recupera del 80% inicial, i es manté per sobre del 90% fins al final del cultiu.

Pel que fa a les variables monitorades en línia, la corba d'oxigen dissolt oscil·la, però amb una tendència decreixent a mesura que la concentració cel·lular s'incrementa, des de la saturació inicial fins a un valor aproximadament del 80% a les 160 h, lluny de qualsevol limitació. Aquest fet referma la possibilitat de prescindir del control d'oxigen dissolt. Durant bona part del segon tram de creixement (de les 97 h a les 144 h), tot i que la concentració cel·lular és aproximadament la mateixa que en el primer, el pO_2 és inferior. Això és degut al fet que el volum total de la unitat augmenta; per tant, el k_La disminueix i es dona una menor capacitat de transferència d'oxigen, de manera que, els valors de pO_2 esdevenen més baixos.

Així mateix, el perfil de pH també distingeix els dos trams del cultiu, assolint un valor de 6,8 unitats al final d'aquest. Segons Jardon i col., aquest valor es conserva dins del rang on no es detecta cap efecte negatiu per al creixement cel·lular (6,7 i 7,7) [44]. De forma que, tant el subministrament de CO_2 a través del cabal d'aeració, així com l'efecte tamponador del medi de cultiu confirmen la possibilitat de prescindir del control de pH. A més, amb l'objectiu d'emprar bosses de cultiu més barates, també es prescindirà del monitoratge del pH.

Cal esmentar que tots dos perfils es veuen finalitzats 8 h abans del temps d'aturada real del cultiu, degut a un problema amb l'ordinador que emmagatzema les dades en línia.

A la Figura 5.38, es mostren els perfils de glucosa i lactat al llarg del cultiu sense infecció, on queden paleses les dues zones d'acumulació cel·lular abans descrites.

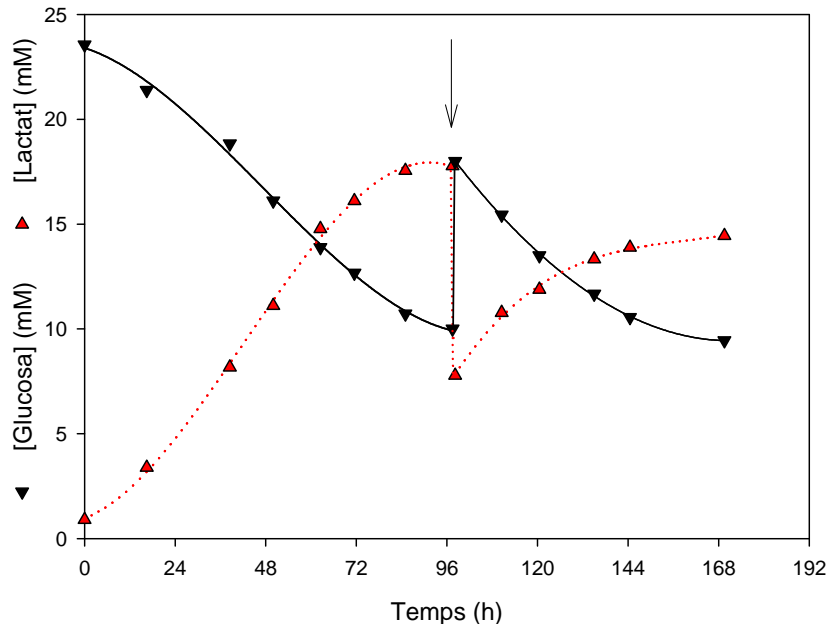


Figura 5.38. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en discontinu en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

Durant el primer tram, la concentració de glucosa davalla des de la dada inicial de 23,5 mM fins a 9,7 mM. En quant al lactat, aquest augmenta la seva concentració de 1 mM fins a 17,8

mM. La forma de les corbes indica que comencen a estabilitzar-se al voltant d'aquests valors finals, ja que algun component limitant desconegut del medi deu trobar-se pròxim a l'exhauriment o bé algun subproducte ha assolit una concentració tòxica per al cultiu, el qual es troba molt pròxim a iniciar la fase estacionària. Per tant, la forma de les corbes referma les 97 h de cultiu, com a moment idoni per addicionar la resta del medi fresc fins arribar al volum final de 10 L.

Un cop afegit el medi, la concentració de glucosa s'enriqueix fins a 18 mM i la de lactat es dilueix fins a 7,8 mM. Tot i que la concentració cel·lular en aquest punt és de $8 \cdot 10^5$ cell/mL, superior a la inoculada i continua evolucionant com s'observa en la Figura 5.37, les variacions acumulades d'ambdós components durant el segon tram d'acumulació són menys significatives que les apreciades abans de l'addició. Aquesta observació pot ser un indicatiu d'un canvi metabòlic de les cèl·lules.

L'addició de medi fresc al cultiu no el transforma en discontinu alimentat, sinó que només es tracta d'un subministrament puntual de medi per assolir el volum de treball que no respon a cap perfil d'addició prèviament dissenyat; tanmateix, el citat canvi metabòlic que es dona, sí que es podria trobar en aquesta addició. Aquest podria tenir relació amb l'efecte de dilució, que provoca l'addició de medi fresc, en alguns components del medi. Així, es coneix que l'amoni pot desregular la glicòlisi per acció sobre un enzim clau com és la fosfofructoquinasa, el qual intervé en les primeres etapes de la ruta glicolítica catalitzant la fosforilació de la fructosa-6-fosfat cap a fructosa-1,6-bifosfat [88]. De manera que en el treball publicat per Lee i col. s'especula amb la possibilitat que la dilució de l'amoni que es produeix en afegir el medi fresc, redueixi l'activació de la fosfofructoquinasa i això minvi l'activitat de la glicòlisi i, amb aquesta, el consum de glucosa. Paral·lelament, també es produeix la reducció de la producció de lactat, que no només es veu afectat per la ralentització de la glicòlisi, sinó també per una possible menor activitat de la glutaminòlisi [62].

5.5.1.2.1. Cultiu amb infecció

A la Figura 5.39, es descriu el comportament del sistema no convencional de producció operant en discontinu amb infecció. La totalitat de les condicions experimentals és idèntica a les fixades en l'anterior experiment.

En base als resultats obtinguts, es disposa d'un ampli rang de densitat cel·lular per infectar que oscil·la des de $10 \cdot 10^5$ cell/mL fins a $20 \cdot 10^5$ cell/mL, donat que dins d'aquest rang no s'observen limitacions de creixement en el cultiu (veure Figura 5.37). Per tant, es determina que la concentració d'infecció serà de $20 \cdot 10^5$ cell/mL. Com en el cas de la producció en discontinu amb el sistema convencional, la infecció es realitzarà únicament amb la introducció de l'inòcul víric amb medi fresc, en aquest cas amb un litre que completi el volum total de cultiu.

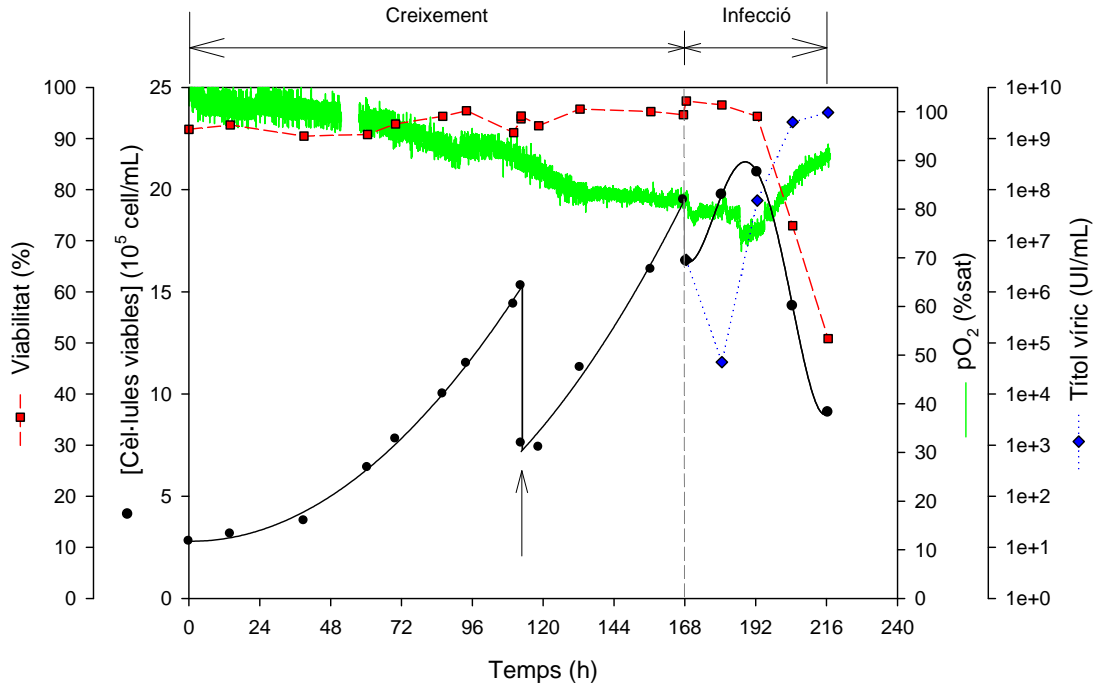


Figura 5.39. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de pO₂ (—), de viabilitat cel·lular (■) i de títol víric (◆) en un cultiu en discontinu amb infecció en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

Es pot advertir com la fase de creixement cel·lular es perllonga fins a les 168 h de cultiu, i la fase d'infecció ho fa fins al moment de recollida, 48 h més tard. De manera que el cultiu dura un total de 216 h, 120 h més que el cultiu en sistema convencional (veure Figura 5.13), degut a les raons abans mencionades que prolonguen la fase de creixement.

Al llarg d'aquesta, tots els perfils representats es comporten de forma molt similar als obtinguts al cultiu de referència. L'experiment comença amb una concentració d'inòcul de $2,8 \cdot 10^5$ cell/mL i un volum de 4 L. Posteriorment, la concentració augmenta fins a $15,3 \cdot 10^5$ cell/mL a les 112 h, moment on s'addicionen 5 L de medi fresc i s'inicia el segon tram de creixement fins a la densitat d'infecció de $19,5 \cdot 10^5$ cell/mL, tot mantenint-se la viabilitat cel·lular aproximadament constant, per sobre del 90%. Pel que fa a la corba d'oxigen dissolt, malgrat una discontinuïtat en les dades emmagatzemades de les 51 h a les 57 h per falta de senyal en la sonda d'oxigen dissolt, aquesta evoluciona de forma decreixent des de la saturació inicial fins aproximadament el 80% en el moment d'infecció.

La fase d'infecció s'inicia a les 168 h amb l'efecte de dilució que provoca la introducció de l'inòcul víric (MOI de 5 UI/cell), el qual redueix la concentració cel·lular a un valor de $16,5 \cdot 10^5$ cell/mL. Les cèl·lules presenten el seu comportament habitual postinfecció i continuen la seva acumulació fins a les 192 h (24 h postinfecció) amb un valor màxim de concentració de $21 \cdot 10^5$ cell/mL. Posteriorment, aquesta concentració, així com la viabilitat, disminueixen fins al final de l'experiment arribant a valors de $9,1 \cdot 10^5$ cell/mL i 50% respectivament. De forma similar a la OUR, el perfil de pO₂ aporta indicacions de l'augment visible del consum d'oxigen del cultiu durant les primeres 27 h postinfecció, i de la posterior

recuperació d'aquest quan les cèl·lules es troben en la fase final del cicle infectiu. Aquest comportament després de la infecció és anàleg al caracteritzat per Monica i col. [33].

La corba d'infecció segueix el seu comportament habitual, amb un títol víric en el moment de recollida de $3,2 \cdot 10^9$ UI/mL que, tal i com queda recollit a la Taula 5.13, implica un augment de la productivitat específica cel·lular amb un valor de 2.000 UI/cell, aproximadament un 50% més respecte el sistema de producció convencional operant en discontinu (veure Taula 5.5).

Paràmetres d'infecció	
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	1,6
MOI teòrica / real (UI/cell)	5 / 3
TOH (h postinfecció)	48
[Títol víric] ₀ (10^6 UI/mL)	4,2
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	3,2
$P_{específica}$ (UI/cell)	2.000

Taula 5.13. Paràmetres infecció en el sistema no convencional operant en discontinu.

Un factor que pot haver influenciat la productivitat específica és el pH. Cal recordar que Jardon i col. no reporten cap influència del pH sobre el creixement cel·lular en el rang entre 6,7 i 7,7 unitats, però no succeeix el mateix amb l'adenovirus, el qual sembla presentar un òptim de producció al voltant d'un pH de 7,2 [44]. En no disposar del control de pH i d'acord amb els resultats obtinguts en l'experiment sense infecció (veure Figura 5.37), aquesta variable podria haver evolucionat fora del valor òptim. Tot i això, el títol víric final i la productivitat vírica són superiors a les del sistema convencional amb control de pH en 7,1 unitats. Resulta també interessant esmentar, però, que existeixen treballs com el de Zhang i col., on s'indica que el control de pH no millora la producció vírica i que el valor de pH de fins a 6,2 unitats no tenen cap efecte negatiu sobre aquesta [89].

Atenent a les respectives densitats d'infecció, les productivitats específiques provinents dels diferents sistemes de producció en discontinu no són consistents amb l'efecte de la densitat cel·lular descrit a l'apartat 5.2.1, ja que a més concentració d'infecció també s'augmenta la productivitat cel·lular. A priori, no es coneix la raó que justifiqui aquest fet; aparentment, es podria pensar que aquest fenomen té relació amb el nou sistema de cultiu: les condicions que s'hi donen podrien afavorir la infectivitat de la cèl·lula, en comportar-se metabòlicament de forma més eficient, com es mostra a la Figura 5.40, on representen els perfils de glucosa i lactat al llarg del cultiu amb infecció.

En aquesta figura, es distingeixen perfectament els dos trams d'acumulació cel·lular al llarg de la fase de creixement i l'addició del medi fresc en les 112 h de cultiu. La glucosa inicial del cultiu és de 22,1 mM i en el moment d'infecció mostra un valor de 7,9 mM; així mateix, la concentració de lactat comença amb 2,4 mM i assoleix al final del segon tram de creixement un valor de 19 mM. En definitiva, cap dels dos compostos té un efecte limitant o inhibitori

sobre el cultiu, donat que es troben fora de les concentracions crítiques indicades a l'apartat 5.4.2.2. Igualment queda patent el canvi metabòlic que provoca la diferència de consum entre els dos trams.

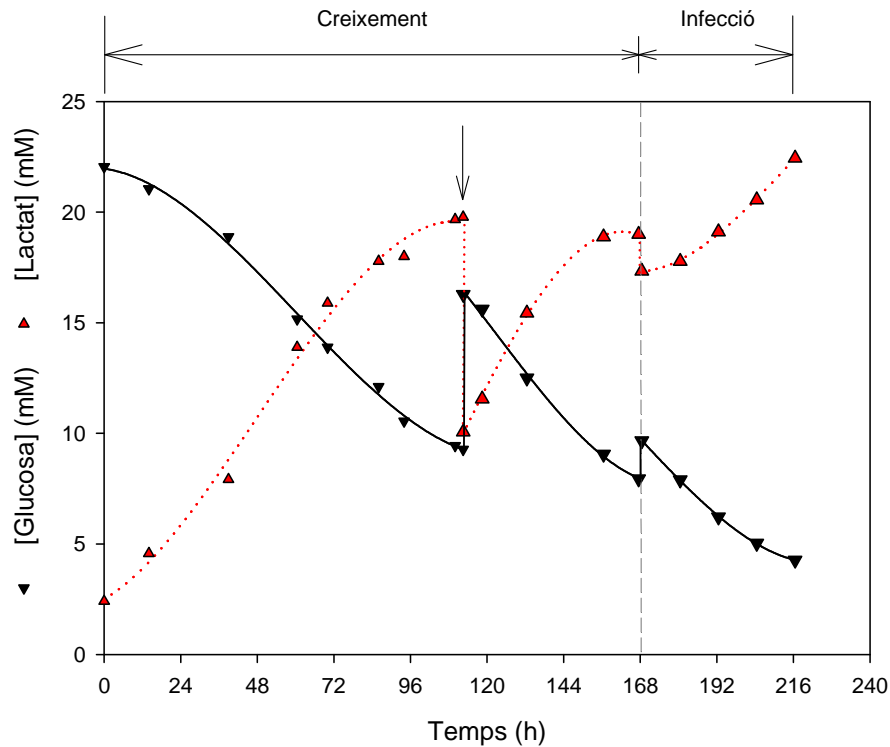


Figura 5.40. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), en un cultiu en discontinu en bioreactor no convencional amb infecció amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

En la fase d'infecció, la tendència a disminuir dels consums acumulats es conserva, arribant la concentració de glucosa i lactat a valors de 4,3 i 22,4 mM respectivament. Si això es confirma amb el càlcul de les velocitats específiques seria la primera vegada on a la fase d'infecció no es dona un augment d'aquestes en comparació amb la de creixement. Relacionat amb això, la disminució en la producció de metabòlits com l'amoni pot haver beneficiat el cultiu, mantenint concentracions durant la fase d'infecció que permetessin superar l'efecte de la densitat cel·lular. Ferreira i col. demostren que l'amoni és un dels majors factors que hi contribueix [90, 91], i el relacionen amb la reducció del pH intracel·lular que juga un important paper en la degradació del DNA adenoviral [63].

Finalment, la comparació dels principals paràmetres cinètics i estequiomètrics dels dos darrers cultius, calculats d'acord amb l'apartat 5.4.2.3, pot corroborar molts dels aspectes discutits fins al moment. A continuació, aquests es mostren a la Taula 5.14.

Paràmetre cinètic	Producció en discontinu		
	Referència	Infecció	
	Creixement	Creixement	Infecció
$\mu_{\text{màx}}$ (h^{-1})	0,0249 / 0,0225	0,0199 / 0,0198	-
t_{dupl} (h)	28 / 31	35 / 35	-
q_{Gluc} ($\text{nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$)	250 / 150	200 / 130	60
q_{Lac} ($\text{nmol}/(10^6 \text{ cell}\cdot\text{h})$)	340 / 130	300 / 150	90
$Y_{\text{Lac/Gluc}}$ (mmol/mmol)	1,4 / 0,9	1,5 / 1,1	1,5
$X_{v,\text{màx}}^*$ (10^6 cell/mL)	2,8	-	2,1

Taula 5.14. Paràmetres cinètics en el sistema no convencional operant en discontinu. Els dos trams de l'etapa de creixement es diferencien per una barra (/). * El valor màxim s'informa a la fase on es dona.

A la vista dels resultats obtinguts, existeixen diversos aspectes que és necessari analitzar i comparar amb les dades procedents del sistema convencional (veure Taula 5.6). Primerament, els valors de la velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{\text{màx}}$) i del temps de duplicació (t_{dupl}) es troben molt pròxims entre sí, no varien ostensiblement d'un tram a un altre de l'etapa de creixement, i són lleugerament superiors als determinats al sistema convencional.

Es confirma el canvi metabòlic durant el segon tram de l'etapa de creixement amb l'alentiment de les velocitats específiques, tant per a la glucosa com per al lactat, fins i tot per sota dels valors del sistema convencional. No obstant, aquestes reduccions no afecten la velocitat específica de creixement: publicacions basades en el cultiu d'hibridomes, com la de Newland i col., afirmen que el creixement cel·lular no es troba limitat per la producció d'energia, sinó per la generació de biomolècules per vies anabòliques [92]. Per tant, la cèl·lula mantindrà el seu creixement, sempre i quan aquestes vies no es vegin afectades i la reducció de velocitats específiques només tindrà afectació en la menor producció de subproductes com el lactat, tal i com es veu a la Figura 5.38 i la Figura 5.40. Tot i això, no es coneix la raó per la qual, per primera vegada, les velocitats específiques durant la fase d'infecció són inferiors a les de la fase de creixement.

5.5.2. Producció en continu amb perfusió

5.5.2.1. Descripció de la producció en continu amb perfusió

A la Figura 5.41, es mostra la totalitat del muntatge experimental per a la producció en continu operant en perfusió utilitzant el sistema no convencional. Un esquema del mateix es pot observar a la Figura 5.43.

Com s'ha pogut constatar en la producció en continu amb perfusió en el bioreactor convencional, el cultiu es veu afectat per la recirculació a través del circuit de filtració extern, tot minvant la seva velocitat específica de creixement i la durada total del procés, ja que les cèl·lules queden sotmeses a períodes d'estrès i de reducció d'oxigen. En el cas del sistema de producció no convencional, aquests inconvenients s'intenten superar gràcies al nou model de cambra de cultiu que s'utilitza, la Cellbag-20L (*perfusion version*).



Figura 5.41. Sistema no convencional (*Wave Bioreactor*): muntatge experimental operant en continu amb perfusió.

La principal característica que distingeix la nova cambra de cultiu emprada és la incorporació d'un element addicional al seu interior, l'anomenat filtre de perfusió. En ésser un component intern, el seu principi de funcionament és similar al del *spin filter* (descriu a l'apartat 5.4.3.1), tot compartint les seves avantatges principals, com l'estalvi del circuit extern de perfusió i la circulació del brou de cultiu a través del mateix. A més, el filtre de perfusió es troba llest per ésser utilitzat dins de la bossa de cultiu preesterilitzada.

El filtre de perfusió que incorpora aquesta cambra de cultiu disposa de 730 cm^2 d'àrea i d'un diàmetre de porus de $0,7 \mu\text{m}$. Aquesta és una mida superior al diàmetre de porus del *hollow fiber* ($0,2 \mu\text{m}$), però continua molt per sota del diàmetre mitjà d'una cèl·lula animal (entre $10 \mu\text{m}$ i $30 \mu\text{m}$) [93], de manera que la retenció cel·lular continua essent total. D'altra banda, el disseny i els materials de construcció li proporcionen prou flotabilitat com perquè es mantingui a sobre de la superfície del brou de cultiu (veure Figura 5.42). Aquest fet, juntament amb el moviment de balanceig de la unitat, redueix l'obturació dels porus, perllonga el temps d'operació òptima de l'element i minimitza l'estrès tallant, amb tanta afectació en el sistema convencional.

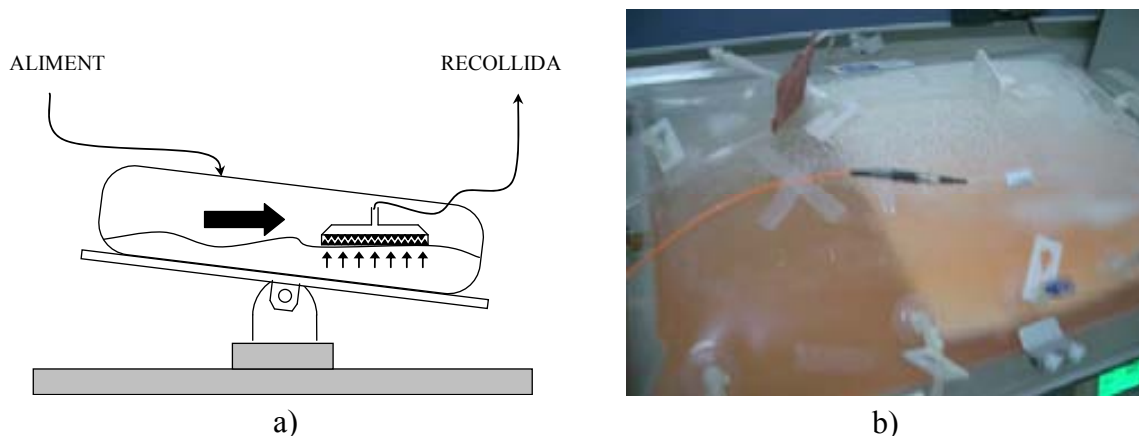


Figura 5.42. a) Esquema de funcionament del filtre de perfusió intern; b) Detall del filtre de perfusió intern sobre la superfície del medi de cultiu.

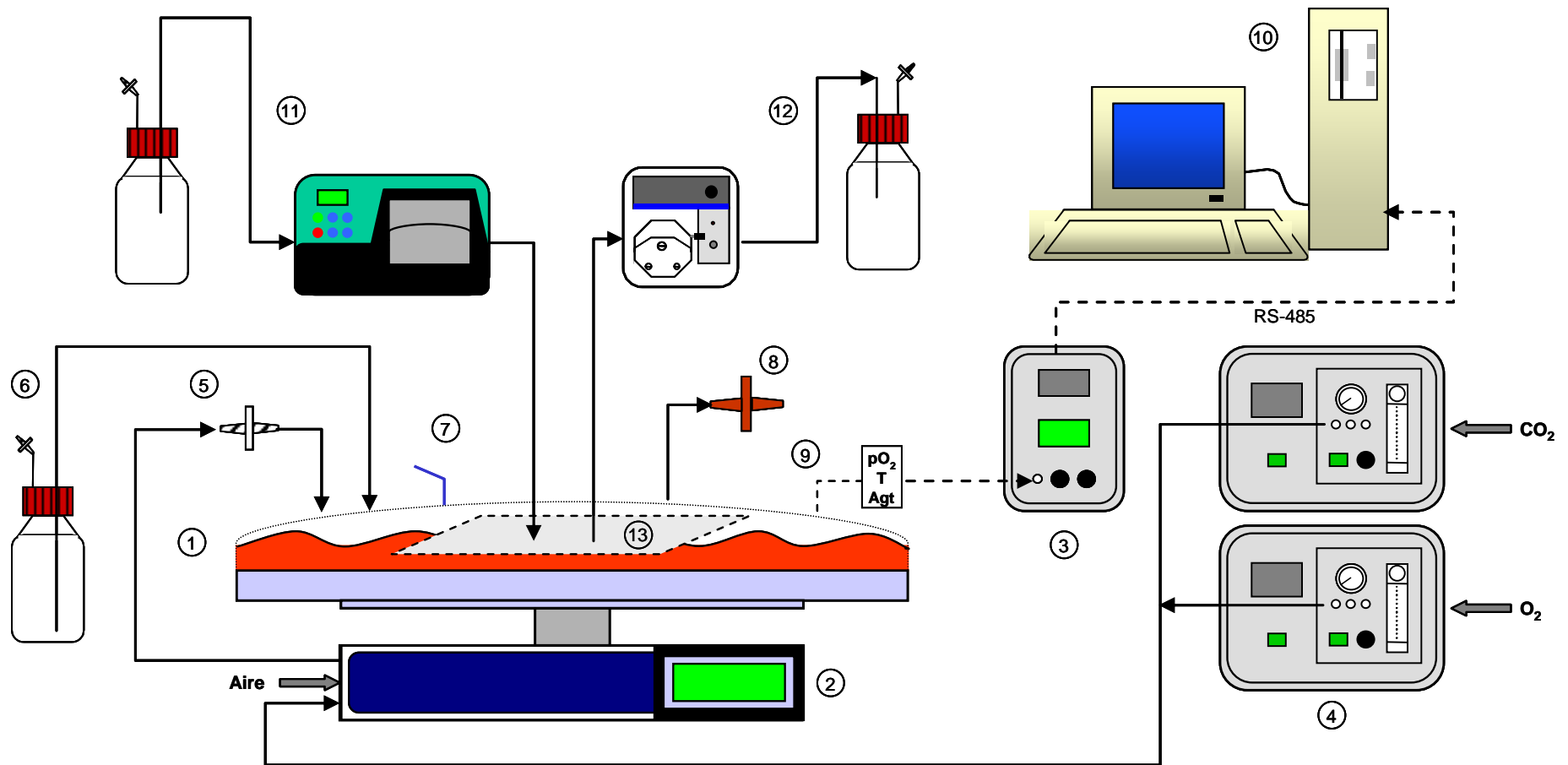


Figura 5.43. Sistema no convencional: esquema del muntatge experimental operant en continu amb perfusió. 1) Cambra de cultiu (10 L); 2) Plataforma d'agitació per balanceig; 3) Unitat de mesura de pO₂; 4) Estacions de mescla de gasos; 5) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 6) Circuit d'inoculació; 7) Presa de mostra manual; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Sondes de temperatura i pO₂; 10) Ordinador de gestió i control; 11) Circuit d'addició de nutrients; 12) Circuit d'eliminació de medi exhaurit; 13) Filtre de perfusió intern.

Tang i col. ja van avaluar aquest dispositiu en la producció d'anticossos monoclonals, mitjançant el cultiu d'hibridomes, amb molt bons resultats de productivitat i períodes d'operació en perfusió superiors a les tres setmanes, sense problemes d'obturació [94].

D'altra banda, el protocol d'addició no es realitza de forma contínua com en el sistema convencional, donat que la manca de la mesura en línia de OUR o d'un control d'addició per pes no ho fa possible. Aquesta es porta a terme de forma manual en semicontinu emprant dues bombes peristàltiques independents i dos tancs, el volum dels quals es troba calibrat (recollida i aliment) (veure Figura 5.43).

En funció dels requeriments de substrat que tingui el cultiu (mesurats a partir dels perfils fora de línia de glucosa i lactat al voltant de la consigna), es determina el volum a alimentar i extreure. Primer es procedeix a l'extracció i, posteriorment, s'addiciona el mateix volum de medi fresc per assegurar que el bioreactor sempre treballa a volum constant. Per minimitzar el nombre d'addicions i els riscos de contaminació, es decideix que s'efectuaran cada 12 h, sempre i quan sigui possible. Descrita, doncs, aquesta característica operació del sistema, la qual es pot designar com de perfusió semicontínua, es decideix augmentar la concentració residual de glucosa fins a 10 mM després de cada addició, en comptes de 5 mM com en el sistema convencional. Així, s'estableix un marge de seguretat de 5 mM per evitar possibles períodes de limitació si la densitat cel·lular és elevada i el consum es dispara, en un determinat període entre addicions.

Per altra part, un avantatge molt interessant que atorga la perfusió semicontínua al protocol d'infecció és la possibilitat d'aprofitar un d'aquests períodes entre addicions per introduir l'alíquota vírica. D'aquesta manera, sempre i quan s'hagin afegit suficients nutrients al cultiu, es pot ampliar el temps d'aturada del protocol (per sobre de les 6 h establertes anteriorment), i facilitar la penetració del virus a l'interior de la cèl·lula, tot minimitzant el risc d'abandonar el sistema a través del filtre de perfusió.

5.5.2.2. Caracterització de la producció en continu amb perfusió

Gràcies a l'experiència i als coneixements adquirits durant els experiments previs de perfusió, l'objectiu primordial del cultiu sense infecció no és analitzar l'aplicació del protocol d'infecció, com ho va ser en el sistema convencional, sinó posar a punt les accions sobre el protocol d'addició per assegurar el creixement exponencial fins assolir la concentració d'infecció.

Com a punt de partida, es prenen els valors establerts dels paràmetres principals que defineixen el protocol d'infecció: el temps d'aturada mínim de 6 h per limitar la pèrdua de virus a través de l'element de filtració, la concentració de glucosa 14 mM prèvia al moment d'infecció, i el cabal constant de 3,6 mL/min d'aliment fresc per sustentar el cultiu fins al moment de recollida. Tot i això, l'ajust final del protocol es produirà segons l'experiència adquirida sobre el propi cultiu.

L'augment de volum del sistema de cultiu no convencional fins a 10 L i la impossibilitat de mesurar l'activitat cel·lular obliguen a reprendre la discussió ja abordada en el bioreactor convencional (veure apartat 5.4.3.2) per tal de fixar la concentració d'infecció. El fet de no disposar de OUR elimina un paràmetre molt valuós per avaluar l'estat del cultiu. En aquest sentit, esperar fins a una concentració d'infecció alta de $80 \cdot 10^5$ cell/mL, sense disposar d'aquesta mesura, podria augmentar els riscos de tenir el cultiu en fase estacionària en el moment d'infecció. Per tant, es decideix prendre un valor de concentració d'infecció més conservador de $50 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual cosa facilitarà també el seu assoliment. Es pren consciència que aquesta modificació pot suposar una diferència a l'hora de comparar els resultats finals. Tot i això, atenent a la capacitat que proporciona la perfusió per mantenir l'estat fisiològic òptim del cultiu durant tota la fase de creixement, totes dues concentracions es podrien considerar com a equivalents.

Els resultats obtinguts del cultiu amb el sistema no convencional de producció operant en continu amb perfusió sense infecció es presenten a la Figura 5.44. Aquest es realitza en les mateixes condicions que el cultiu en discontinu: medi 293 SFMII, suplementat amb 4 mM de glutamina i 50 ppm d'antiescumejant C. Pel que fa a les variables de control, el cultiu també es desenvolupa sota les mateixes consignes emprades durant la producció en discontinu: temperatura de 37 °C, velocitat de balanceig de 20 rpm, angle de balanceig de 7°, cabal d'aeració de 0,2 L/min d'aire amb una concentració de pCO₂ de 8%. No s'implementa control d'oxigen dissolt, ni es mesura el pH.

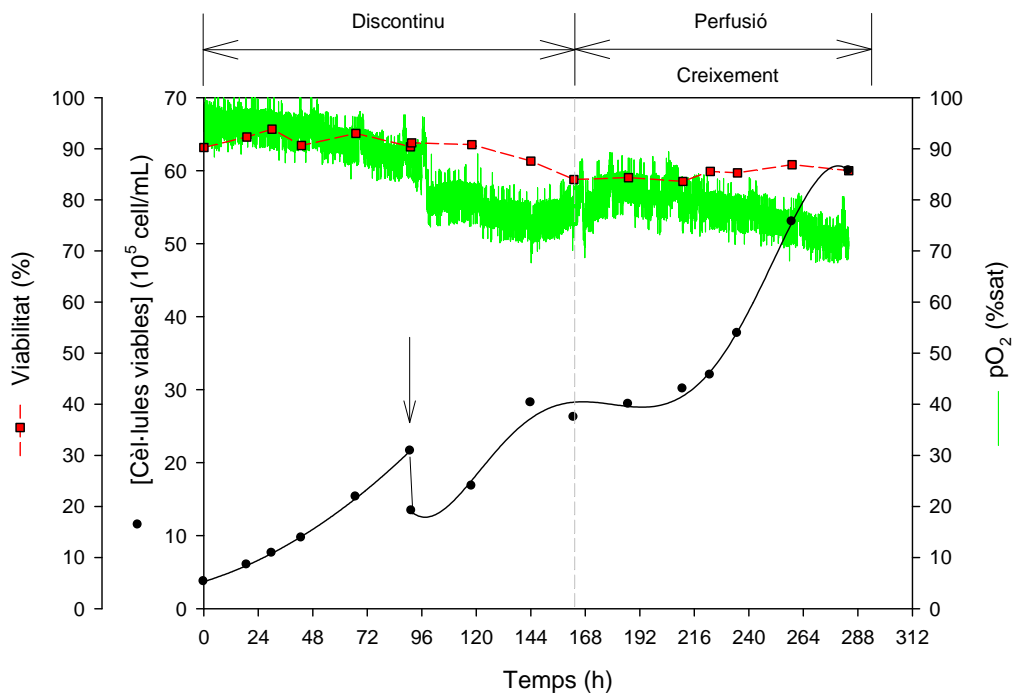


Figura 5.44. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de pO₂ (—) i de viabilitat cel·lular (■) en un cultiu en perfusió en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

L'etapa en discontinu comença amb una concentració de $3,7 \cdot 10^5$ cell/mL i un volum de 5 L de medi, i el primer tram de creixement evoluciona fins a les 91 h amb una densitat cel·lular final de $21 \cdot 10^5$ cell/mL. La posterior addició de la resta de medi allarga el segon tram fins a les 163 h, moment on s'inicia l'etapa de perfusió, amb una concentració de $26 \cdot 10^5$ cell/mL, lleugerament inferior a la mostra prèvia recomptada 20 h abans. Aquest fet ja indica que l'activació de la perfusió s'hauria d'haver anticipat a les 143 h de cultiu. Molt probablement, el comportament de l'activitat cel·lular en el perfil de OUR ho hauria suggerit. Precisament, el fet de no disposar d'aquesta mesura atorga més importància a la concentració cel·lular de la fase exponencial en la producció en discontinu (veure Figura 5.37), situada al voltant de $20 \cdot 10^5$ cell/mL, a l'hora de determinar la transició entre el fi de l'etapa en discontinu i l'inici de la perfusió.

L'etapa en perfusió s'inicia amb un augment de l'agitació per balanceig fins a 25 rpm i de l'angle fins a 9° per tal d'augmentar la capacitat de transferència d'oxigen del bioreactor, en previsió de més acumulació cel·lular. Tot i això, l'efecte del retard en l'arrencada provoca un període estacionari, que es prolonga de forma excessiva durant les primeres 48 h de la perfusió (fins a les 211 h), on es perd viabilitat. Finalment, gràcies a les accions correctores portades a terme i descrites a continuació, el cultiu es recupera i assoleix la densitat d'infecció de $53 \cdot 10^5$ cell/mL a les 259 h de cultiu. Es permet que l'experiment assoleixi les 284 h, moment on es dona per finalitzat.

Tant durant l'etapa en discontinu com durant la fase de creixement de l'etapa de perfusió, el perfil d'oxigen dissolt mostra un comportament que confirma la descripció de la corba de cèl·lules viables. Durant tota l'etapa en discontinu, decreix des de la saturació fins al voltant del 75%; durant l'etapa de perfusió, l'augment de les consignes de balanceig, així com l'estat fisiològic del cultiu, fan que la concentració d'oxigen dissolt es recuperi, però en reactivar-se el creixement del cultiu, aquesta torna a decreixer fins situar-se aproximadament al 70%.

A la Figura 5.45, es mostra el protocol d'addició seguit, i les seves conseqüències sobre els perfils de glucosa i lactat durant l'experiment.

Les concentracions de glucosa i lactat a l'inici de l'experiment són 22,7 mM i 0,6 mM respectivament, i assoleixen uns valors finals en discontinu de 7,5 mM per a la glucosa i 12,3 mM per al lactat. Com era d'esperar, cap de les dues últimes dades pot donar peu a un fenomen d'exhauriment o d'inhibició sobre les cèl·lules, per tant, la fase estacionària, a la que arriba el cultiu a les 163 h, té relació amb algun altre component que necessitaria d'anàlisis posteriors per ésser detectat.

A partir de l'inici de l'etapa en perfusió, els perfils d'ambdós metabòlits prenen una forma de "dents de serra", característica de l'aplicació del protocol d'addició en semicontinu.

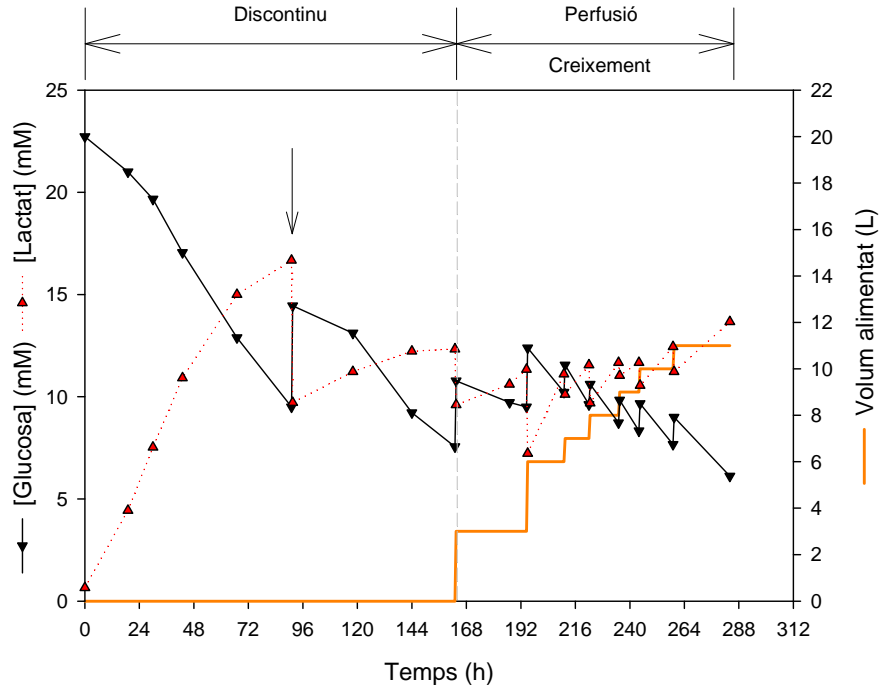


Figura 5.45. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), i del volum alimentat (—) en un cultiu en perfusió en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

Inicialment es va dissenyar un protocol d'addició progressiu, incrementant el volum del medi fresc afegit empíricament, d'acord amb la velocitat de creixement cel·lular i el consum per tal de mantenir la concentració residual de nutrients de consigna (10 mM de glucosa). Dissortadament, aquesta proposta s'abandona davant del problema que suposa el llarg període estacionari a l'inici de la perfusió, descrit en la Figura 5.44. De manera que, per recuperar el cultiu el més ràpid possible, s'afegeixen inicialment 3 L de medi fresc a les 163 h i 30 h després es tornen a afegir. A partir d'aquest moment, es comença a percebre la recuperació del cultiu i s'aporten addicions contínues de 1 L, aproximadament cada 12 h, fins al final del cultiu. Quan la línia cel·lular torna a presentar un bon creixement, els recanvis de 1 L no són suficients per mantenir les concentracions controlades, la qual cosa provoca que la glucosa derivi aproximadament des de 12 mM a 8 mM (descartada l'última mostra, on el cultiu ja es donava per finalitzat), i el lactat ho fa de 7 mM a 12,5 mM. La forma poc abrupta dels perfils entre addició i addició, ja dona una indicació que els consums acumulats no són molt elevats. Al final del cultiu, el volum total alimentat és de 11 L.

5.5.2.2.1. Cultiu amb infecció

El resultat obtingut del cultiu amb *Wave Bioreactor* operant en continu amb perfusió i posterior infecció es presenta a la Figura 5.46. Aquest es realitza en les mateixes condicions que el cultiu anterior, tant pel que fa a la composició del medi com als valors de les variables de control i proporciona l'oportunitat d'aplicar novament el protocol d'addició dissenyat originàriament.

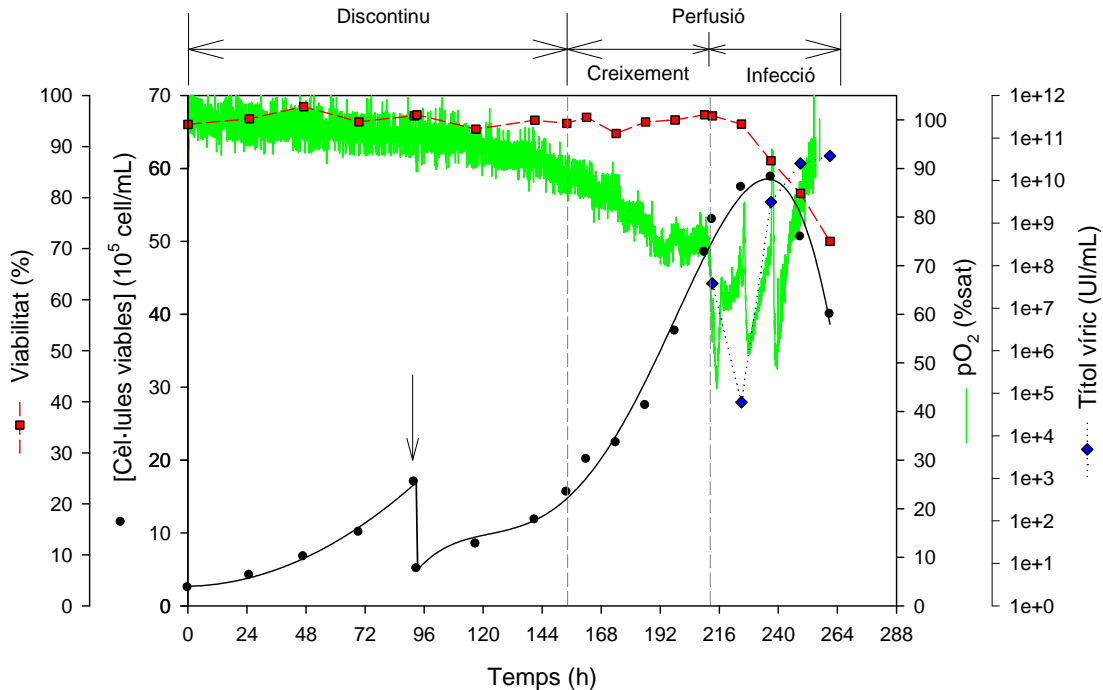


Figura 5.46. Perfils de concentració de cèl·lules viables (●), de pO₂ (—), de viabilitat cel·lular (■) i de títol víric (◆) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

El comportament de l'etapa en discontinuu és força similar al descrit a la Figura 5.44. En aquest cas, el tram inicial es porta a terme amb un inòcul de $2,5 \cdot 10^5$ cell/mL i un volum de 3 L de medi; arribades les 92 h de cultiu, es procedeix a l'addició de la resta de medi. El segon tram del discontinuu progressa fins a les 154 h de cultiu, moment on la densitat cel·lular assoleix un valor de $15,6 \cdot 10^5$ cell/mL. Per evitar la fase estacionària observada en l'anterior experiment, es decideix que és el moment d'iniciar la fase d'acumulació cel·lular en perfusió.

La seva evolució posa de manifest el tret més característic de la corba de creixement. En la totalitat dels anteriors cultius en perfusió, s'adverteix el període d'adaptació per part de les cèl·lules a l'element de retenció cel·lular, és a dir, en major o menor mesura, sempre es troba un període on la velocitat específica de creixement disminueix per recuperar-se després. En canvi, aquest fenomen ja no s'observa a la corba de cèl·lules viables, les quals continuen progressant sense veure's afectades pel filtre de perfusió fins assolir la concentració d'infecció de $53 \cdot 10^5$ cell/mL aproximadament a les 213 h (46 h abans que a l'anterior perfusió), i sembla corroborar la hipòtesi que la fase estacionària advertida per a la concentració cel·lular de la Figura 5.44 és deguda només al retard en activar la perfusió.

La corba d'oxigen dissolt no mostra cap comportament anòmal; decreix de forma continuada fins que l'increment de la velocitat de balanceig a 25 rpm i de l'angle a 9° estableixen la seva tendència al voltant del 75% de saturació.

Durant la fase d'infecció, la densitat i la viabilitat cel·lulars mantenen els perfils habituals. La primera progressa durant 24 h postinfecció, abastant una concentració màxima de $59 \cdot 10^5$ cell/mL i després decau fins a $40 \cdot 10^5$ cell/mL a les 261 h, 48 h postinfecció del moment de

recollida. En el mateix instant, la viabilitat, la qual pren valors durant tot el procés per sobre del 95%, finalitza la seva caiguda al 71%.

A la Figura 5.47 es pot veure l'aspecte característic del cultiu en el moment de recollida.

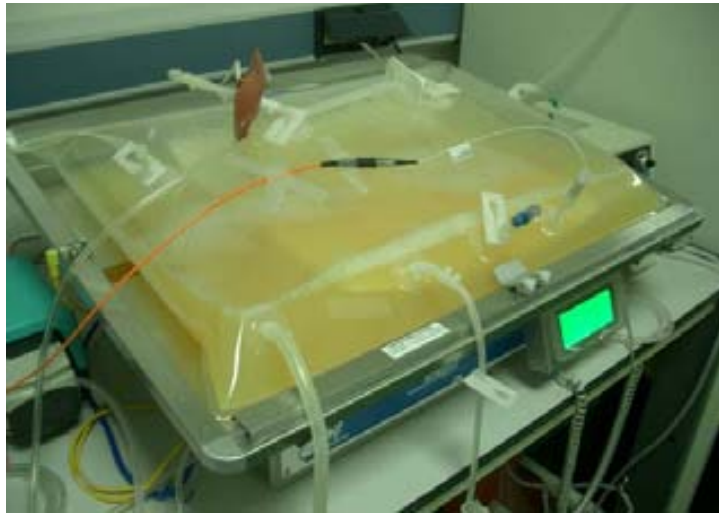


Figura 5.47. Producció en sistema no convencional operant en perfusió: Detall del cultiu al final de la fase d'infecció, destaca el color verdós característic de l'elevat nivell d'expressió de la proteïna GFP.

El perfil d'oxigen dissolt descriu una evolució erràtica caracteritzada per disminucions abruptes que coincideixen amb els períodes d'extracció i addició de medi fresc. Durant la infecció, l'aturada de l'agitació juntament amb l'increment del consum d'oxigen demandat per un nombre de cèl·lules infectades tan elevat fan que el pO_2 disminueixi sobtadament, la posterior reactivació del balanceig recupera la concentració d'oxigen dissolt que cada vegada deriva més cap a la saturació en avançar la infecció i disminuir la concentració de cèl·lules viables.

La corba de titulació vírica presenta la forma prèviament descrita en tots els experiments amb infecció anteriors. La MOI real pren un valor de 7 UI/cell, i s'assoleix una titulació vírica en el moment de la recollida de $3,7 \cdot 10^{10}$ UI/mL. La resta de paràmetres d'infecció es recopilen a la Taula 5.15.

Paràmetres d'infecció	
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	5,3
MOI teòrica / real (UI/cell)	5 / 7
TOH (h postinfecció)	48
[Títol víric] ₀ (10^6 UI/mL)	38
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	37
$P_{específica}$ (UI/cell)	7.000

Taula 5.15. Paràmetres d'infecció en el sistema de producció no convencional operant en continu amb perfusió.

El valor de la productivitat específica cel·lular és el màxim aconseguit al llarg de tots els experiments amb infecció plantejats en el present treball, i millora en més de 3 vegades el

valor que s'extreu de la producció en discontinu de l'últim experiment amb infecció (veure Taula 5.13). Segons el treball publicat per Jardon i col., una raó que pot justificar aquest augment de productivitat són les addicions puntuals de medi, les quals, a banda del millor estat fisiològic de les cèl·lules, ajuden a mantenir el pH en un rang controlat i pròxim a l'òptim de producció de 7,2 [44].

De manera anàloga a la Figura 5.45, la Figura 5.47 mostra el protocol d'addició i els perfils de glucosa i lactat durant l'experiment.

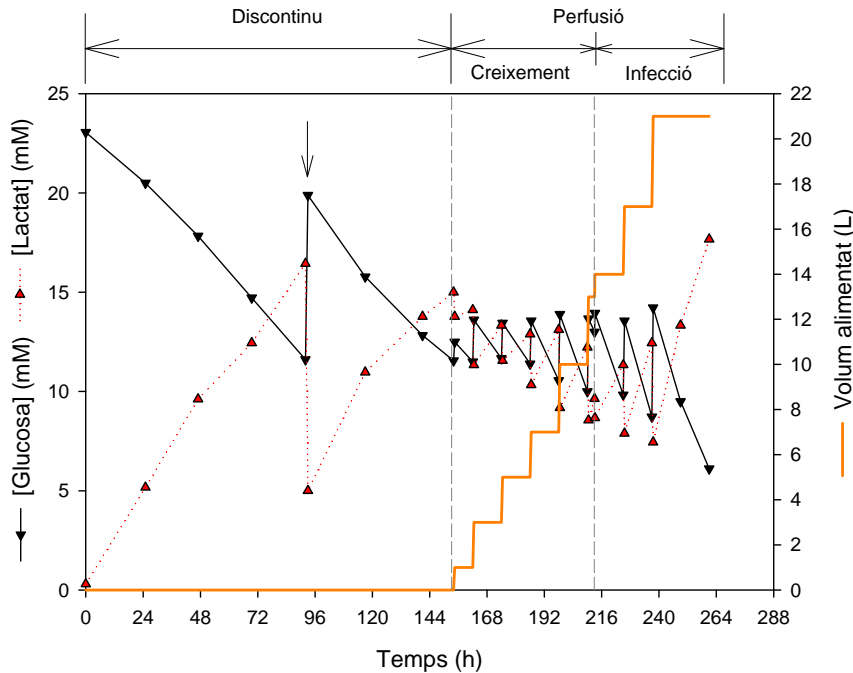


Figura 5.48. Perfils de concentració dels principals metabòlits, glucosa (▼) i lactat (▲), i del volum alimentat (—) en un cultiu en perfusió amb infecció en bioreactor no convencional amb medi 293 SFMII. La sageta indica el moment en què se suplementa la resta del medi de cultiu.

Al llarg de l'etapa en discontinu es confirma el comportament precedent dels perfils dels dos metabòlits que assoleixen al final de l'etapa uns valors de 15 mM de glucosa i 11,5 mM de lactat.

En aquest cas sí que, amb l'inici de l'etapa en perfusió a les 154 h, s'aplica el protocol originàriament ideat d'addicions progressives de medi fresc cada 12 h en funció de les demandes del cultiu. Aquest comença per un 1 L/addició i finalitza en 3 L/addició, tot just abans d'introduir l'inòcul víric, i aconsegueix complir l'objectiu de mantenir controlada la concentració de glucosa, després de cada actuació, aproximadament en 14 mM, a diferència de l'anterior protocol que no ho aconseguia (veure Figura 5.45). Com a resultat, s'obté un perfil coherent que es reflexa en el creixement, contínuament exponencial de la Figura 5.46.

Durant la fase d'infecció, en previsió de la major demanda de nutrients per part de la cèl·lula, s'addicionen 4 L/addició durant els dos dies, la qual cosa assegura una concentració de glucosa de 6,1 mM i de lactat de 17,7 mM en el moment de recollida. Al final del cultiu, el volum total alimentat és de 21 L, quasi el doble que en l'anterior perfusió. Cal tenir molt

present que la implementació d'aquest mateix protocol automatitzat, gràcies a un control de pes, permetria optimitzar la quantitat total de medi emprat i estalviar costos en aquest aspecte.

La Taula 5.16 recull els paràmetres cinètics i estequiomètrics de la producció en continu amb perfusió emprant el *Wave Bioreactor*.

Paràmetre cinètic	Producció en continu amb perfusió				
	Referència		Infecció		
	Discontinuu	Creixement	Discontinuu	Creixement	Infecció
Durada (h)	284		264		
X_{v,0} (10⁶ cell/mL)	0,37	-	0,25	-	-
μ_{màx} (h⁻¹)	0,0194 / 0,0199	0,014	0,0206 / 0,0213	0,0194	-
t_{dupl} (h)	36 / 35	49	33 / 32	36	-
q_{Gluc} (nmol/(10⁶ cell·h))	210 / 50	50	180 / 140	80	100
q_{Lac} (nmol/(10⁶ cell·h))	340 / 40	70	230 / 130	60	110
Y_{Lac/Gluc} (mmol/mmol)	1,6 / 0,8	1,4	1,3 / 0,9	0,8	1,1
X_{v,màx}* (10⁶ cell/mL)	-	6,0	-	-	5,9
Vel_{perf}[§] ♦ (vol/dia)	-	0,2	-	0,5	0,4

Taula 5.16. Paràmetres cinètics en el sistema no convencional operant en continu amb perfusió. Els dos trams de l'etapa de creixement en discontinuu es diferencien per una barra (/).* El valor màxim s'informa a la fase on es dona. [§]Valor mitjà; ♦ 1 vol = 10 L

En primer lloc, les velocitats específiques de creixement i els temps de duplicació durant l'etapa en discontinuu són similars en els dos experiments, però lleugerament més elevats que en el bioreactor convencional (veure Taula 5.11). L'augment significatiu d'aquests dos paràmetres en l'etapa de perfusió del cultiu de referència deixa palesa la menor activitat fisiològica de les cèl·lules, provocada pel retard en l'activació de la perfusió; no així en el cultiu amb infecció, el qual només incrementa el temps de duplicació de l'etapa de perfusió entre 3 h i 4 h.

D'acord amb l'apartat 5.5, la principal raó d'aquest fenomen és la disminució de les condicions d'estrès que pateixen les cèl·lules al bioreactor, la qual es basa en tres factors fonamentals. Primerament, el canvi del filtre de fibres buides i del circuit extern de recirculació pel filtre de perfusió flotant, la qual cosa elimina l'efecte de cisalla que pateixen les cèl·lules que circulen pel seu interior. D'altra banda, la substitució de l'agitació mecànica, més estressant, per l'agitació per balanceig. I, finalment, l'eliminació del sistema d'aeració per bombolleig directe, a resultes de l'aprofitament d'aquest moviment amb la generació d'ones que afavoreixen la transferència d'oxigen a través de tota la superfície del medi de cultiu.

Es confirma la disminució de les velocitats específiques de glucosa i lactat, durant el segon tram d'acumulació cel·lular en discontinuu i aquesta tendència continua a la fase de creixement de l'etapa en perfusió, a diferència del bioreactor convencional. Malgrat tot, el procés de

producció adenoviral fa que ambdós paràmetres presentin l'habitual, encara que lleuger, repunt en els seus valors.

Finalment, les velocitats de perfusió presenten valors inferiors als de la Taula 5.11, degut probablement al fet que la concentració d'infecció és inferior en el cas no convencional. Tot i això, cal destacar que durant la fase d'infecció en el cultiu no convencional, la velocitat de perfusió roman per sota i molt pròxima al valor de la fase de creixement, la raó d'aquest fet igualment es deu trobar en la disminució de les velocitats específiques de consum.

5.6. Comparació dels sistemes de producció

La comparació dels sistemes de producció de vectors adenovirals es pot tractar en base a dues vessants fonamentals: en primer lloc, des de les característiques operacionals pròpies dels sistemes emprats (bioreactor Biostat Bplus i *Wave Bioreactor*) i, en segon, des dels resultats pròpiament obtinguts en cadascun d'ells.

D'aquesta manera, el bioreactor de tanc agitat Biostat Bplus (sistema convencional) es caracteritza per presentar una major complexitat operacional per implementar les estratègies de cultiu, sobretot en el cas de la perfusió; però, com a contrapartida, el grau de maduresa tecnològica del monitoratge i el control és molt alt, la qual cosa permet extreure molta informació del bioprocés en etapes de desenvolupament. Com a conseqüència, és un sistema molt exigent a l'hora de complir amb la normativa GMP.

En canvi, el *Wave Bioreactor* (sistema no convencional), fonamentat en les tecnologies d'un sol ús, es caracteritza per la seva senzillesa i robustesa de funcionament. Pel contrari, però, al menys momentàniament, la capacitat d'implementar sistemes de control i monitoratge avançats. Tot plegat fa del bioreactor un sistema òptim de producció, més fàcilment adaptable a la normativa GMP, però del que és més complex extreure dades durant el desenvolupament.

Tanmateix, es creu convenient invertir esforços en posteriors treballs per millorar-lo, tot incorporant els avantatges dels que gaudeix el bioreactor de tanc agitat. Sobretot en referència al monitoratge en línia de l'activitat cel·lular, a través de la mesura de la OUR, i al control del cabal d'alimentació en la perfusió.

Pel que fa als resultats obtinguts al llarg d'aquest capítol, a la Taula 5.17, es recullen els principals paràmetres en cadascun dels sistemes de producció, d'acord amb l'estratègia utilitzada en cada cas.

Les diferències en el volum d'operació dels dos sistemes i la variabilitat en la MOI, deguda aquesta última a la dificultat intrínseca que presenta la manipulació de vectors adenovirals, no eviten que la productivitat específica cel·lular es pugui utilitzar com a principal element de comparació.

Paràmetre	Sistema de producció Convencional		Sistema de producció No convencional	
	Discontínu	Perfusió	Discontínu	Perfusió
V_R (L)	2	2	10	10
Vel_{perf} creixement / infecció (dia^{-1})	-	1 / 2,4*	-	0,6 / 0,4
$X_{v,inf}$ (10^6 cell/mL)	1,0	7,8	1,6	5,3
N_{inf} (10^9 cell totals)	2	15,6	16	53
MOI teòrica / real (UI/cell)	5 / 3	5 / 12	5 / 3	5 / 7
[Títol víric] ₀ (10^6 UI/mL)	3,2	93	4,2	38
[Títol víric] _{final} (10^9 UI/mL)	1,3	44	3,2	37
$P_{específica}$ (UI/cell)	1.300	5.500	2.000	7.000

Taula 5.17. Comparació dels principals paràmetres que caracteritzen les alternatives de producció de vectors adenovirals. *Valor mitjà.

En referència a l'estratègia, aquella que opera en continu amb perfusió sempre resulta més productiva que la que ho fa en discontinu; fins i tot en el cas on el sistema convencional opera en perfusió i el no convencional ho fa en discontinu, amb un nombre de cèl·lules totals aproximadament similar en ambdós. Un paràmetre a destacar d'aquest mode d'operació és la velocitat de perfusió, inferior en el cas del sistema de producció no convencional respecte el convencional; tot i que la concentració residual de glucosa mitjana (10 mM) és superior a la que es manté en el sistema convencional (5 mM). La principal raó d'aquest fet és, probablement, la decisió de reduir la concentració d'infecció en el *Wave Bioreactor*, encara que la disminució dels paràmetres cinètics relacionats amb els metabòlits (q_{Gluc} i q_{Lac}), també podria tenir relació.

Pel que fa al sistema en sí mateix, aparentment, el sistema no convencional *Wave Bioreactor* resulta més productiu que el convencional, independentment de l'estratègia. No obstant, en aquesta comparació també cal considerar l'efecte de la densitat cel·lular, el qual aconsella tenir presents dos factors molt influents: l'estratègia de cultiu i la concentració d'infecció.

En discontinu, com s'ha comentat a l'apartat 5.5.1.2.1, els resultats no el corroborarien, doncs en augmentar la concentració d'infecció també augmenta la productivitat. Dit això, tot indica que el sistema de cultiu no convencional proporciona una millor eficiència metabòlica de la cèl·lula, la qual cosa es relaciona amb els paràmetres cinètics i d'infecció avaluats (veure Taula 5.14). En el cas de l'estratègia en continu amb perfusió, es podria suposar que la major concentració cel·lular d'infecció en el sistema convencional, afectaria negativament la productivitat específica respecte la calculada en el sistema no convencional. Malgrat tot, les concentracions d'infecció no disten tant les unes de les altres en els dos experiments i des d'un punt de vista metabòlic, en ambdós casos, la cèl·lula no mostra cap indicatiu d'activitat limitada o inhibida en el moment d'infecció. Basant-se en aquesta premissa, les concentracions d'infecció es poden considerar equivalents per als experiments.

Una vegada analitzada l'etapa de producció i els factors que la defineixen, no només a nivell dels resultats d'infecció obtinguts, sinó també de cara al compliment i aplicació de la normativa GMP de fabricació, es disposa del material inicial per afrontar la següent etapa del bioprocés: la purificació.

5.7. Bibliografia

1. Kamen, A. and Henry, O. 2004. *Development and optimization of an adenovirus production process*. The Journal of Gene Medicine 6 Suppl 1: S184-192.
2. Nadeau, I. and Kamen, A. 2003. *Production of adenovirus vector for gene therapy*. Biotechnology advances 20(7-8): 475-489.
3. Altaras, N.E., Aunins, J.G., Evans, R.K., Kamen, A., Konz, J.O. and Wolf, J.J. 2005. *Production and formulation of adenovirus vectors*. Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260.
4. Gad, S.C. 2007. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*. 1st ed. New York (NY): John Wiley & Sons Inc. 1659 p.
5. Singhvi, R., Markusen, J.F., Ky, B., Horvath, B.J. and Aunins, J.G. 1996. *Assessment of virus infection in cultured cells using metabolic monitoring*. Cytotechnology 22(1): 79-85.
6. Raghunand, N. and Dale, B.E. 1999. *Alteration of glucose consumption kinetics with progression of baculovirus infection in Spodoptera frugiperda cells*. Applied biochemistry and biotechnology 80(3): 231-242.
7. Dominguez, J., Lorenzo, M.M. and Blasco, R. 1998. *Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry*. Journal of immunological methods 220(1-2): 115-121.
8. Kussow, C.M., Zhou, W., Gryte, D.M. and Hu, W.S. 1995. *Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement*. Enzyme and Microbial Technology 17(9): 779-783.
9. Zeiser, A., Bedard, C., Voyer, R., Jardin, B., Tom, R. and Kamen, A.A. 1999. *On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements*. Biotechnology and bioengineering 63(1): 122-126.
10. Akhnoukh, R., Kretzmer, G. and Schügerl, K. 1996. *On-line monitoring and control of the cultivation of Spodoptera frugiperda Sf9 insect cells and -galactosidase production by Autographa californica virus vector*. Enzyme and Microbial Technology 18(3): 220-228.
11. Hensler, W.T. and Agathos, S.N. 1994. *Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells*. Cytotechnology 15(1): 177-186.
12. Kamen, A.A., Bedard, C., Tom, R., Perret, S. and Jardin, B. 1996. *On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures*. Biotechnology and bioengineering 50(1): 36-48.
13. Wong, T.K.K., Nielsen, L.K., Greenfield, P.F. and Reid, S. 1994. *Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of Sf9 insect cells infected with a recombinant baculovirus*. Cytotechnology 15(1): 157-167.

14. Côté, J., Bourget, L., Garnier, A. and Kamen, A. 1997. *Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring*. *Biotechnology progress* 13(6): 709-714.
15. Vojinovic, V., Cabral, J.M.S. and Fonseca, L.P. 2006. *Real-time bioprocess monitoring Part I: In situ sensors*. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 114(2): 1083-1091.
16. Konstantinov, K.B., Pambayun, R., Matanguihan, R., Yoshida, T., Perusicn, C.M. and Hu, W.S. 1992. *On-line monitoring of hybridoma cell growth using a laser turbidity sensor*. *Biotechnology and bioengineering* 40(11): 1337-1342.
17. Wu, P., Ozturk, S.S., Blackie, J.D., Thrift, J.C., Figueroa, C. and Naveh, D. 1995. *Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors*. *Biotechnology and bioengineering* 45(6): 495-502.
18. Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Stegbauer, K. and Wolf, B. 1997. *Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures*. *Biosensors and Bioelectronics* 12(1): 29-41.
19. Lo, C.M., Keese, C.R. and Giaever, I. 1995. *Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing*. *Biophysical journal* 69(6): 2800-2807.
20. Bittner, C., Wehnert, G. and Scheper, T. 1998. *In situ microscopy for on-line determination of biomass*. *Biotechnology and bioengineering* 60(1): 24-35.
21. Guan, Y., Evans, P.M. and Kemp, R.B. 1998. *Specific heat flow rate: An on-line monitor and potential control variable of specific metabolic rate in animal cell culture that combines microcalorimetry with dielectric spectroscopy*. *Biotechnology and bioengineering* 58(5): 464-477.
22. Ozturk, S.S., Blackie, J., Wu, P., Taticek, R., Konstantinov, K., Matanguihan, C., Tsai, Y., Yoon, S., Thrift, J. and Naveh, D. 1997. *On-line monitoring for consistent and optimal production of biologicals from mammalian cell cultures in ESACT Conference*. Dordrecht, Netherlands.
23. Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C. and Archambault, J. 1993. *Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 9(1): 13-21.
24. Kurokawa, H., Park, Y.S., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1994. *Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations*. *Biotechnology and bioengineering* 44(1): 95-103.
25. Ozturk, S.S., Thrift, J.C., Blackie, J.D. and Naveh, D. 1997. *Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor*. *Biotechnology and bioengineering* 53(4): 372-378.
26. Wang, J., Honda, H., Lenas, P., Watanabe, H. and Kobayashi, T. 1995. *Effective tPA production by BHK cells in nutrients-controlled culture using an on-line HPLC measuring system*. *Journal of fermentation and bioengineering* 80(1): 107-110.

27. Campmajo, C., Cairo, J.J., Sanfeliu, A., Martinez, E., Alegret, S. and Godia, F. 1994. *Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis*. Cytotechnology 14(3): 177-182.
28. Jorgensen, E., Casablancas, A., González, G. and F., G. 1997. *On-line monitoring of glutamine and ammonium in mammalian cell cultures in ESACT Conference*. Dordrecht, the Netherlands.
29. Shabram, P.W., Giroux, D.D., Goudreau, A.M., Gregory, R.J., Horn, M.T., Huyghe, B.G., Liu, X., Nunnally, M.H., Sugarman, B.J. and Sutjipto, S. 1997. *Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles*. Human Gene Therapy 8(4): 453-465.
30. Nielsen, L.K., Smyth, G.K. and Greenfield, P.F. 1992. *Accuracy of the endpoint assay for virus titration*. Cytotechnology 8(3): 231-236.
31. Gilbert, R., Garnier, A., Jacob, D. and Kamen, A. 2000. *On-line measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production*. Biotechnology letters 22: 561-567.
32. Sandhu, K.S. and Al-Rubeai, M. 2008. *Monitoring of the adenovirus production process by flow cytometry*. Biotechnology progress 24(1): 250-261.
33. Monica, T.J., Montgomery, T., Ayala, J.L., Schoofs, G.M., Whiteley, E.M., Roth, G., Garbutt, J.J., Harvey, S. and Castillo, F.J. 2000. *Monitoring adenovirus infections with on-line and off-line methods*. Biotechnology progress 16(5): 866-871.
34. Gamez, X. 2000. *Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals basades en eines de control i instrumentació*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
35. Lecina, M. 2007. *Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
36. Lovrecz, G. and Gray, P. 1994. *Use of on-line gas analysis to monitor recombinant mammalian cell cultures*. Cytotechnology 14(3): 167-175.
37. Eyer, K., Oeggerli, A. and 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*. Biotechnology and bioengineering 45(1): 54-62.
38. Dorresteyn, R.C., Numan, K.H., De Gooijer, C.D., Tramper, J. and Beuvery, E.C. 1996. *On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations*. Biotechnology and bioengineering 51(2): 206-214.
39. Zhou, W. and Hu, W.S. 1994. *On-line characterization of a hybridoma cell culture process*. Biotechnology and bioengineering 44(2): 170-177.
40. Lecina, M., Soley, A., Gracia, J., Espunya, E., Lazaro, B., Cairo, J.J. and Godia, F. 2006. *Application of on-line OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors*. Journal of biotechnology 125(3): 385-394.

41. Maranga, L., Aunins, J.G. and Zhou, W. 2005. *Characterization of changes in PER.C6™ cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector*. Biotechnology and bioengineering 90(5): 645-655.
42. Xie, L., Metallo, C., Warren, J., Pilbrough, W., Peltier, J., Zhong, T., Pikus, L., Yancy, A., Leung, J., Aunins, J.G. and Zhou, W. 2003. *Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 cell culture under sparging conditions*. Biotechnology and bioengineering 83(1): 45-52.
43. Xie, L., Pilbrough, W., Metallo, C., Zhong, T., Pikus, L., Leung, J., Aunins, J.G. and Zhou, W. 2002. *Serum-free suspension cultivation of PER.C6® cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions*. Biotechnology and bioengineering 80(5): 569-579.
44. Jardon, M. and Garnier, A. 2003. *pH, pCO₂, and temperature effect on R-adenovirus production*. Biotechnology progress 19(1): 202-208.
45. Schoofs, G., Monica, T.J., Ayala, J., Horwitz, J., Montgomery, T., Roth, G. and Castillo, F.J. 1998. *A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy*. Cytotechnology 28: 81-89.
46. Frazzati-Gallina, N.M., Paoli, R.L., Mourão-Fuches, R.M., Jorge, S.A.C. and Pereira, C.A. 2001. *Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers*. Journal of biotechnology 92(1): 67-72.
47. Merten, O.W., Manuguerra, J.C., Hannoun, C. and Van der Werf, S. 1999. *Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures*. Developments in biological standardization 98: 23-38.
48. Iyer, P., Ostrove, J.M. and Vacante, D. 1999. *Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production*. Cytotechnology 30(1): 169-172.
49. Nadeau, I., Garnier, A., Côté, J., Massie, B., Chavarie, C. and Kamen, A. 1996. *Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies*. Biotechnology and bioengineering 51(6): 613-623.
50. Nadeau, I., Jacob, D., Perrier, M. and Kamen, A. 2000. *293SF metabolic flux analysis during cell growth and infection with an adenoviral vector*. Biotechnology progress 16(5): 872-884.
51. Nadeau, I., Gilbert, P.A., Jacob, D., Perrier, M. and Kamen, A. 2002. *Low-protein medium affects the 293SF central metabolism during growth and infection with adenovirus*. Biotechnology and bioengineering 77(1): 91-104.
52. Cortin, V., Thibault, J., Jacob, D. and Garnier, A. 2004. *High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture*. Biotechnology progress 20(3): 858-863.
53. Ozturk, S.S. and Hu, W.S. 2005. *Cell Culture Technology For Pharmaceutical And Cell-based Therapies*: Taylor & Francis Group p.

54. Trampler, F., Sonderhoff, S.A., Pui, P.W.S., Kilburn, D.G. and Piret, J.M. 1994. *Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells*. *Nature Biotechnology* 12(3): 281-284.
55. Henry, O., Dormond, E., Perrier, M. and Kamen, A. 2004. *Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures*. *Biotechnology and bioengineering* 86(7): 765-774.
56. Yuk, I.H.Y., Olsen, M.M., Geyer, S. and Forestell, S.P. 2004. *Perfusion cultures of human tumor cells: a scalable production platform for oncolytic adenoviral vectors*. *Biotechnology and bioengineering* 86(6): 637-642.
57. Marjanovic, D. and Greller, G. 2007. *Disposable bioreactors based on wave agitation technology How using disposable bioreactors for cell cultivation can help speed up time-to-market*. *Pharmaceutical Technology Europe* 19(2): 30.
58. Spier, R.E. and Kadouri, A. 1997. *The evolution of processes for the commercial exploitation of anchorage-dependent animal cells*. *Enzyme and Microbial Technology* 21(1): 2-8.
59. Carswell, K.S. and Papoutsakis, E.T. 2000. *Culture of human T cells in stirred bioreactors for cellular immunotherapy applications: shear, proliferation, and the IL-2 receptor*. *Biotechnology and bioengineering* 68(3): 328-338.
60. Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M. 1991. *Growth inhibition in animal cell culture: The effect of lactate and ammonia*. *Applied biochemistry and biotechnology* 30(1): 29-41.
61. Sanfeliu, A. 1995. *Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i el metabolisme cel·lulars*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
62. Lee, Y.Y., Yap, M.G.S., Hu, W.-S. and Wong, K.T.K. 2003. *Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production*. *Biotechnology progress* 19(2): 501-509.
63. Ferreira, T.B., Carrondo, M.J.T. and Alves, P.M. 2007. *Effect of ammonia production on intracellular pH: Consequent effect on adenovirus vector production*. *Journal of biotechnology* 129(3): 433-438.
64. Piña, M. and Green, M. 1969. *Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and nononcogenic human adenovirus*. *Virology* 38(4): 573.
65. Hodge, L.D. and Scharff, M.D. 1969. *Effect of adenovirus on host cell DNA synthesis in synchronized cells*. *Virology* 37(4): 554-564.
66. Nadeau, I., Seanez, G. and Wu, F. 2001. *Adenovirus production in 293 cells: a comparative study between a suspension cell and an adherent cell process in ESACT Conference*. Tylosand, Sweden.

67. Zhou, W., Chen, C.C., Buckland, B. and Aunins, J. 1997. *Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production*. *Biotechnology and bioengineering* 55(5): 783-792.
68. Bibila, T.A., Ranucci, C.S., Glazomitsky, K., Buckland, C. and Aunins, J.G. 1994. *Monoclonal antibody process development using medium concentrates*. *Biotechnology progress* 10(1): 87-96.
69. Garnier, A., Côté, J., Nadeau, I., Kamen, A. and Massie, B. 1994. *Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells*. *Cytotechnology* 15(1-3): 145-155.
70. Siegwart, P., Côté, J., Male, K., Luong, J.H., Perrier, M. and Kamen, A. 1999. *Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures*. *Biotechnology progress* 15(4): 608-616.
71. Henry, O., Perrier, M. and Kamen, A. 2005. *Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors*. *Metabolic engineering* 7(5-6): 467-476.
72. Ozturk, S.S. 1996. *Engineering challenges in high density cell culture systems*. *Cytotechnology* 22(1): 3-16.
73. Liu, H., Liu, X.M., Li, S.C., Wu, B.C., Ye, L.L., Wang, Q.W. and Chen, Z.L. 2009. *A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(5): 524-529.
74. Longley, R., Radzniak, L., Santoro, M., Tsao, Y.S., Condon, R.G.G., Lio, P., Voloch, M. and Liu, Z. 2005. *Development of a Serum-free Suspension Process for the Production of a Conditionally Replicating Adenovirus using A549 Cells*. *Cytotechnology* 49(2): 161-171.
75. Zhang, S., Handa-Corrigan, A. and Spier, R.E. 1993. *A comparison of oxygenation methods fro high-density perfusion culture of animal cells*. *Biotechnology and bioengineering* 41(7): 685-692.
76. Maiorella, B., Dorin, G., Carion, A. and Harano, D. 1991. *Crossflow Microfiltration of Animal Cells*. *Biotechnology and bioengineering* 37(2): 121-126.
77. Seamans, T.C. and Hu, Q.S. 1990. *Kinetics of growth and antibody production by a hybridoma cell line in a perfusion culture*. *Journal of fermentation and bioengineering* 70(4): 241-245.
78. Van't Riet, K. 1979. *Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels*. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 18(3): 357-364.
79. Miller, W.M., Blanch, H.W. and Wilke, C.R. 2000. *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH*. *Biotechnology and bioengineering* 67(6): 853-871.

80. Higareda, A.E., Possani, L.D. and Ramirez, O.T. 1997. *The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures*. Biotechnology and bioengineering 56(5): 555-563.
81. Ramirez, O.T. and Mutharasan, R. 1990. *Cell cycle-and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures*. Biotechnology and bioengineering 36: 839-848.
82. Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A. 1993. *Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells*. Cell 75: 477-477.
83. Nakano, M.Y. and Greber, U.F. 2000. *Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry*. Journal of Structural Biology 129(1): 57-68.
84. Singh, V. 1999. *Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation*. Cytotechnology 30(1): 149-158.
85. Singh, V. 2007. *Wave Disposable Bioreactors - a Pioneering Technology*. BioPharm International 20(10): 84.
86. BioProcess, G.H.B. 2008. *Using the Wave Bioreactor disposable cell culture system*. System 20/50EHT: GE Healthcare Bio-Sciences AB. 95 p.
87. Knevelman, C., Hearle, D.C., Osman, J.J., Khan, M., Dean, M., Smith, M., Aiyedebinu, A. and Cheung, K. 2002. *Characterisation and operation of a disposable bioreactor as a replacement for conventional stem in place inoculum bioreactors for mammalian cell culture processes in 224th National Meeting of the American Chemical Society*. Boston, MA.
88. Uyeda, K. and Racker, E. 1965. *Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism VII. Hexokinase and phosphofructokinase*. Journal of Biological Chemistry 240(12): 4682-4688.
89. Zhang, S., Pham, H., Senesac, J. and Gallagher, S., *Production of adenoviral vectors for gene therapy in suspension serum free cultures*, in *Viral Vectors and Vaccines*, T.W.B. Foundation, Editor. 2004: Williamsburg, VA.
90. Ferreira, T.B., Ferreira, A.L., Carrondo, M.J.T. and Alves, P.M. 2005. *Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production*. Biotechnology letters 27(22): 1809-1813.
91. Ferreira, T.B., Ferreira, A.L., Carrondo, M.J.T. and Alves, P.M. 2005. *Effect of re-feed strategies and non-ammoniogenic medium on adenovirus production at high cell densities*. Journal of biotechnology 119(3): 272-280.
92. Newland, M., Greenfield, P.F. and Reid, S. 1990. *Hybridoma growth limitations: The roles of energy metabolism and ammonia production*. Cytotechnology 3(3): 215-229.
93. Eibl, R., Eibl, D., Portner, R., Catapano, G. and Czermak, P. 2009. *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 1st ed. Heidelberg: Springer Verlag. 363 p.

94. Tang, Y.J., Ohashi, R. and Hamel, J.F.P. 2007. *Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG2a monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system*. *Biotechnology progress* 23(1): 255-264.

6. PURIFICACIÓ

6. PURIFICACIÓ

A diferència del capítol anterior, on la millora de la producció se centrava l'estudi de l'operació unitària de bioreacció, tot incidint en els seus factors principals, la purificació consisteix en un seguit d'operacions unitàries diferents que integren una determinada estratègia, amb l'objectiu principal de recuperar el producte desitjat del brou de cultiu i portar-lo fins a una formulació final el més pura i estable possible. El disseny correcte del procés de purificació implica, de forma inherent, minimitzar les impureses presents, així com maximitzar el rendiment global de recuperació del producte desitjat, tot mantenint la seva activitat. Aquestes fites han de ser assumides amb un criteri d'enginyeria adaptat a l'escala de producció que demanda el mercat, i basat en l'optimització de costos que faci d'aquesta etapa el més competitiva possible.

Tot i que no existeix una estratègia de purificació ideal i els rendiments globals han de ser contínuament millorats, la selecció i l'ordre correcte de les operacions unitàries que assoliran els objectius abans mencionats rau fonamentalment en l'estudi detallat de les propietats fisicoquímiques del producte que es vol purificar (el vector adenoviral), i de les característiques dels contaminants o impureses presents en el brou de cultiu on aquest es troba. Com més coneixement es tingui d'aquests aspectes, més senzill serà trobar diferències que portin al disseny d'operacions i a la definició d'una seqüència que permetin una separació més ràpida i eficient.

6.1. Propietats del brou de cultiu

De forma molt general, el procés de purificació de l'adenovirus recombinant consisteix en l'aïllament dels virions madurs del brou de cultiu contingut en el bioreactor, on es troben també les cèl·lules infectades suspeses en el medi. Cal tenir present que fins i tot amb productivitats víriques molt elevades, el producte present en el brou de cultiu només representa una fracció molt reduïda del volum final del procés de producció [1].

A banda dels components cel·lulars, la composició específica d'aquest brou té com a base els diferents components del medi de cultiu 293 SFMII, seleccionat per al procés de producció, i els seus suplementos. Tal i com es descriu al capítol d'estudis previs, aquest és un medi comercial i lliure de sèrum, específicament dissenyat amb la finalitat de mantenir cultius d'alta densitat de cèl·lules HEK293 creixent en suspensió. L'absència de sèrum a la seva formulació i la baixa concentració de proteïnes (<10 mg/L) faciliten la purificació. El principal suplement afegit al medi és l'antiescumejant per minimitzar el problema de formació d'escumes i millorar l'aeració superficial durant el cultiu cel·lular en bioreactor.

La seva composició inicial en sals inorgàniques, aminoàcids, vitamines, carbohidrats, etc... és complexa, desconeguda i varia al llarg del temps de cultiu degut al creixement cel·lular, a l'exhauriment dels nutrients i a la secreció dels subproductes metabòlics que generen les cèl·lules durant la seva expansió i el posterior procés d'infecció per part de l'adenovirus. Cal considerar que durant el cicle infectiu i degut a la lisi cel·lular que se'n deriva, s'alliberen addicionalment importants quantitats de DNA que afecten la reologia del fluid, tot augmentant la seva viscositat, atrapant partícules víriques i representant un autèntic inconvenient per obtenir el grau de puresa terapèutic desitjat, tal i com es veurà en apartats posteriors.

6.2. Propietats fisicoquímiques de l'adenovirus

Les principals propietats fisicoquímiques de l'adenovirus tals com la mida del virió, el seu coeficient de difusió o l'estructura de la càpside, entre d'altres, diferencien específicament el producte d'interès de la resta de components que integren el brou de cultiu i actuen com a contaminants. Per tant, el seu coneixement és de vital importància per al disseny de les operacions que conformaran l'estratègia òptima de purificació, dins de l'ampli ventall de tècniques de separació existents.

- Estabilitat tèrmica: la temperatura és el principal factor que pot afectar el virió. La major estabilitat del mateix es dona entre 2 °C i 8 °C, i es redueix progressivament fins als 45 °C, on es produeix la desnaturalització de l'estructura quaternària de les proteïnes que formen part de la càpside [2].
- Estabilitat front al pH: de forma general, a temperatura ambient, la major estabilitat del virió es dona dins del rang fisiològic de pH (entre 7,0 i 9,0), durant períodes que poden arribar a una setmana [3, 4].

- Forma, mida i pes molecular: aquests esdevenen tres factors força importants en la purificació de qualsevol nanopartícula. Cal recordar que l'adenovirus presenta dues unitats fonamentals que l'integren: la càpside i, en el seu interior, el genoma. La forma de la càpside recorda un icosaèdre amb 12 protuberàncies situades en cadascun dels seus vèrtex anomenades fibres; mitjançant microscòpia electrònica s'ha pogut estimar un diàmetre de 83 nm (vèrtex a vèrtex) [5]. D'altra banda, el pes molecular de la partícula d'adenovirus serotipus 5 s'ha determinat per espectroscòpia amb un valor de $167 \cdot 10^6$ Da [6]; la qual cosa corrobora que aquest producte és més gran que bona part dels biofàrmacs comunament purificats, com per exemple les proteïnes terapèutiques.
- Difusió: El coeficient de difusió de l'adenovirus serotipus 5 en solució a 37 °C és de $4,46 \cdot 10^{-12}$ m²/s, aproximadament 50 vegades inferior al de proteïnes com la insulina [6, 7]. Aquesta baixa difusivitat sumada a la seva mida disminueixen la competitivitat de l'adenovirus per accedir als llocs actius de les reïnes de purificació front a molts contaminants d'origen proteic.
- Estructura molecular: la càpside del virió es troba composta per 252 subunitats anomenades capsòmers, de les quals 240 consisteixen en capsòmers-hexon i la resta capsòmers-penton. Els capsòmers-hexon es troben formats per trímers de proteïna II i representen entre el 50% i el 60% de la proteïna total del virió; per tant, aquests dominen les característiques de càrrega de la partícula [8]. En concret, cadascun dels monòmers presenta una càrrega neta de -23,8, proporcionant a la càpside una càrrega neta global negativa per sobre de -17.000 a pH fisiològic de 7, pH on, com s'ha dit, el virió posseeix més estabilitat [5, 9]. Les càrregues atorguen a la partícula un valor del punt isoelèctric (pI) aproximadament de 6.

6.3. Estratègies de purificació

De forma general, el procés de separació d'una biomolècula es pot dividir esquemàticament en tres seccions principals: purificació inicial, purificació intermèdia i purificació final, les quals es troben formades per una o més operacions bàsiques [10].

En funció del grau de puresa desitjat en el producte d'interès, aquestes seccions es poden combinar per simplificar l'estratègia de purificació. Els productes emprats per a l'administració *in vivo* en organismes, com és el cas dels vectors adenovirals per a teràpia gènica, requereixen uns estàndards de puresa molt elevats, la qual cosa obliga a tenir presents totes i cadascuna de les seccions abans mencionades. Moltes vegades també són necessàries un seguit d'etapes auxiliars que actuen com a nexes entre les diverses seccions, per tractar-ne els efluents i ajustar-ne el seu volum i/o les condicions d'acord amb la següent etapa.

A la Figura 6.1, es poden observar les tres seccions amb les corresponents etapes principals.

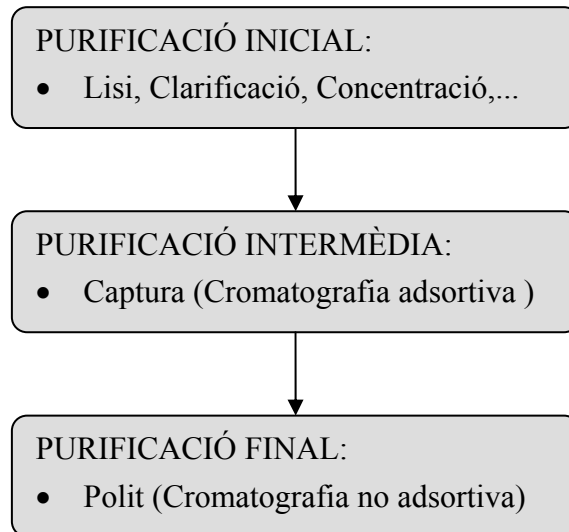


Figura 6.1. Esquema general del procés de purificació de vectors adenovirals.

Durant la purificació inicial, s'ha de procedir a la recollida i l'alliberament del producte d'interès, si aquest no s'excreta al medi de cultiu; a continuació, s'executen operacions de separació menys específiques, com l'eliminació de restes cel·lulars macroscòpiques, mitjançant un procés de separació sòlid-líquid anomenat clarificació. Aquesta secció pot finalitzar amb la reducció del volum a tractar per estalviar cost econòmic i temps d'operació en etapes posteriors. Les operacions bàsiques típiques poden incloure la lisi cel·lular, la filtració, la centrifugació o la precipitació.

La purificació intermèdia comprèn una o varies operacions que tenen com a objectiu principal la captura específica del producte, basant-se en una o varies propietats intrínseques que el diferencien dels contaminants. En canvi, la secció de purificació final consisteix habitualment en una única operació de separació, donat que tracta el mínim volum al llarg del procés; en aquesta secció es realitza el polit del procés de purificació, per eliminar de forma acurada aquelles impureses més complexes, no eliminades en etapes anteriors per ser més semblants al producte final.

En aquest punt, cal fer un incís per parlar de la cromatografia com a tècnica de separació principal en les dues últimes seccions de purificació, degut al seu elevat rendiment i potencialitat per diferenciar els components d'una mescla.

Dins de les extenses alternatives que ofereix aquesta operació bàsica, la cromatografia líquida en columna és la tècnica de separació més emprada en els processos biotecnològics. El seu principi de separació es basa en la interacció reversible fonamentada en alguna propietat fisicoquímica (càrrega neta, mida, hidrofobicitat, etc...) dels components presents en una fase líquida (fase mòbil), en circular a través d'un llit fix format per minúscules partícules esfèriques de reïna sòlida (fase estacionària), tal i com s'esquematitza a la Figura 6.2.

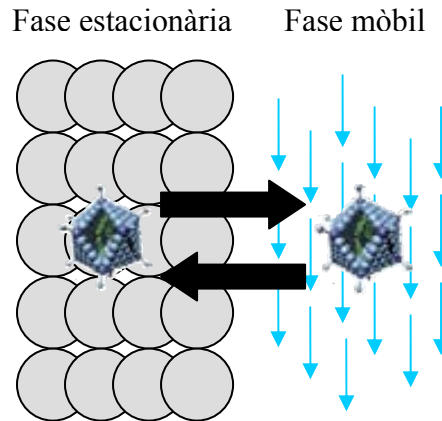


Figura 6.2. Principi de separació per cromatografia.

La circulació de la fase mòbil a l'interior de la columna es pot aconseguir mitjançant la pressió exercida per gravetat, en sistemes oberts molt senzills, tot i que en la majoria d'ocasions, és una bomba la que la impulsa.

L'abans mencionada interacció dels components amb la reïna genera diferents graus de retenció sobre els components, els quals afecten el temps d'elució de la columna. Segons aquesta interacció, la cromatografia es pot classificar en dos tipus:

- Cromatografia adsortiva: els components de la fase mòbil queden adherits en major o menor mesura a la superfície de la reïna. Les principals classes de cromatografia adsortiva són la cromatografia de bescanvi iònic, la cromatografia d'interacció hidrofòbica, la cromatografia de fase reversa i la cromatografia d'afinitat. Permet operar a fluxos elevats, tot reduint el temps d'operació, i, en general, concentra el producte. A la majoria de processos biotecnològics, durant la captura s'utilitza exclusivament cromatografia adsortiva, tot i que també és possible emprar-la durant la secció de polit.
- Cromatografia no adsortiva: les partícules de la fase mòbil no queden adherides en cap moment a la superfície de la reïna; la separació únicament es deu a la diferència de mida de les partícules que han de circular a través de la fase estacionària. La cromatografia d'exclusió molecular és l'únic tipus i s'utilitza, normalment, durant la secció de polit.

Durant el present treball, s'aplicaran dues estratègies diferents per a la purificació de vectors adenovirals obtinguts al llarg del procés de producció amb el bioreactor no convencional de 10 L operant en perfusió: l'estratègia de purificació escalable i la no escalable.

Com s'ha esmentat a la introducció, la diferència entre les dues estratègies es basa en la possibilitat d'augmentar les dimensions de les unitats on tenen lloc les operacions que integren l'esquema, si així ho requereix el volum d'aliment a processar. Com es veurà en posteriors apartats, en el cas de l'estratègia de purificació no escalable, la ultracentrifugació és l'operació limitant en quant a escalabilitat.

D'acord amb l'objectiu global del treball d'obtenir vectors adenovirals a escala industrial, l'estratègia que veritablement s'analitza en profunditat és la que té possibilitats d'augmentar d'escala. No obstant, l'estratègia no escalable s'avalua per obtenir una mostra de referència de vector adenoviral pur i per poder comparar els paràmetres globals obtinguts, en la mesura del possible.

Per qüestions de cost, en cap de les dues es disposa d'equips amb l'escala (volum) necessària per tractar la totalitat del contingut del bioreactor de 10 L. Per tant, ambdues estratègies es desenvoluparan utilitzant alíquotes de menor volum i els resultats obtinguts serviran per extrapolar els valors a una escala superior.

6.4. Estratègia no escalable

Tal i com s'ha comentat en la introducció, tradicionalment la purificació de vectors adenovirals en quantitats per abastar propòsits de recerca s'ha donat gràcies al desenvolupament d'aquesta estratègia, que van portar a terme Green i col. durant l'any 1962 [11]. Les etapes que configuren l'estratègia de purificació no escalable es poden observar a la Figura 6.3.

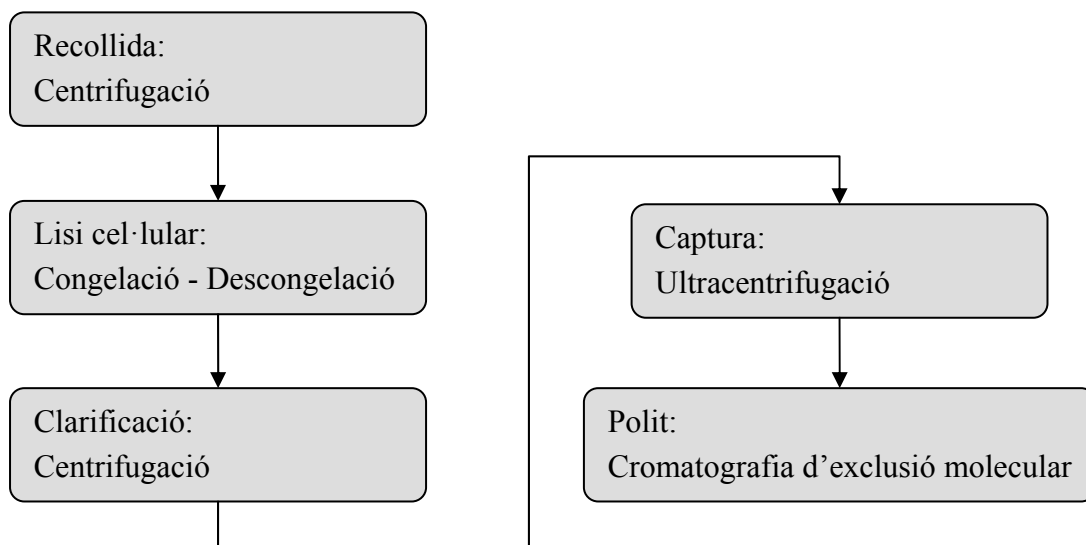


Figura 6.3. Etapes de l'estratègia de purificació no escalable de vectors adenovirals.

La secció de purificació inicial comença amb la recollida de la fracció de cultiu més rica en partícules adenovirals per començar a ésser tractada. Per tal d'assegurar el total alliberament dels vectors adenovirals de l'interior de les cèl·lules, és necessari aplicar un procediment de lisi cel·lular. Tot seguit, cal eliminar les restes macroscòpiques existents mitjançant el procés de clarificació.

L'etapa més característica de tot aquest esquema de purificació és la ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi (CsCl), la qual esdevé l'única operació de la secció de purificació intermèdia. Finalment, la secció de purificació final consisteix en una etapa de cromatografia

d'exclusió molecular per eliminar les traces d'impureses que restin.

6.4.1. Recollida

Bona part dels virions produïts durant l'etapa de producció escapen inevitablement de l'interior de les cèl·lules infectades. Aquest fet resulta com a conseqüència de la naturalesa lítica del virus i de la impossibilitat de sincronitzar la infecció en totes les cèl·lules. D'altra banda, també està associat a paràmetres del cicle infectiu com el temps de recollida (TOH = 48 h postinfecció) i la multiplicitat d'infecció (MOI = 5 UI/cell) que generen partícules víriques en excés. Per tant, és important escollir quina serà la fracció del cultiu cel·lular a col·lectar per iniciar el seguit d'etapes.

Recollir la fracció vírica únicament associada a l'interior de les cèl·lules implica la reducció preliminar del volum a processar i, per consegüent, la reducció de la mida i del cost dels equips relacionats. A més, tal i com s'ha descrit al capítol de producció, el títol víric associat a la fracció del sobrenedant només representa aproximadament un 10% del títol víric total; per tant, la seva pèrdua podria jutjar-se com a menyspreable. Finalment, tot i que aquest extrem no queda justificat a la bibliografia, alguns autors consideren el virus present en la fracció del sobrenedant de menor qualitat per haver quedat exposat durant més temps a les condicions de l'entorn extracel·lular [12].

D'acord amb aquest conjunt de raons i recordant que l'estratègia es troba limitada pel baix volum que pot processar la ultracentrifugació, es procedeix a seleccionar únicament la fracció de virions intracel·lulars i descartar el sobrenedant del cultiu. Per tant, es realitza la recollida d'una alíquota significativa de 225 mL del bioreactor en el TOH, la posterior centrifugació d'aquesta, i finalment la seva resuspensió en sobrenedant per tal d'obtenir un volum final aproximadament 10 vegades inferior a l'original. Per reduir al mínim l'alliberament incontrolat de virions durant la centrifugació, degut al trencament de la membrana de les cèl·lules (més sensible durant la infecció [13]), aquesta es porta a terme amb una RCF reduïda de 500 G durant 5 minuts. Finalment, el pèl·let resultant es resuspèn en un volum total de 20 mL.

6.4.2. Lisi cel·lular

Un cop recollit el pèl·let, és necessari alliberar els adenovirus de l'interior d'aquelles cèl·lules que han mantingut la seva integritat. Aprofitant, ara sí, que les cèl·lules amb una càrrega adenoviral alta són molt fràgils, existeixen diversos mètodes per portar a terme el seu trencament.

El mètode més comú i senzill és la congelació i descongelació del material recollit durant tres cicles consecutius. Tot i que fins a una escala limitada, aquest mètode resulta molt atractiu donat que l'equip requerit és fàcilment disponible; a mesura que augmenta l'escala de purificació, aquest procediment resulta més lent i difícil de controlar. Cal considerar que, si bé un procés de congelació i descongelació sota condicions favorables pot alliberar per sobre del

90% del virus contingut a les cèl·lules, el control incorrecte d'aquesta etapa pot conduir a la pèrdues superiors a un 50%. Com a conseqüència, és aconsellable reduir el temps dels dos procediments al mínim possible, per millorar l'estabilitat del material inicial [1]. La microfluidització també és una alternativa emprada i relativament senzilla d'implementar. La pressió requerida en un microfluiditzador per alliberar la pràctica totalitat del virus és relativament petita (1.000 psi) [14]. Pressions superiors poden afectar les fibres de la càpside i disminuir considerablement el rendiment d'aquesta etapa fins a un 20% [1]. Finalment, també és possible la utilització de detergents químics (per exemple, Tween o Triton X-100) a baixes concentracions per solubilitzar els lípids de la membrana cel·lular i afavorir el seu trencament. Aquesta alterativa requereix d'un estudi addicional de les concentracions òptimes de detergent, així com de la cinètica d'alliberament de les partícules per optimitzar-ne l'eficiència.

Considerant els diferents avantatges i desavantatges de les possibles alternatives, i aprofitant el reduït volum de l'alíquota que s'obté de l'etapa prèvia, el procés de congelació i descongelació durant tres cicles és l'opció escollida per a la lisi cel·lular. Com a equip de congelació, s'utilitza un refrigerador a -80°C (NuAire); per descongelar i evitar que la temperatura arribi a valors que puguin inactivar els virions, es disposa d'un bany d'aigua termostàtic a 37°C .

6.4.3. Clarificació

El virus queda alliberat pràcticament en la seva totalitat de l'interior de les cèl·lules un cop superada l'anterior etapa de lisi. Tot i això, si la composició de l'alíquota ja era inicialment molt complexa, ara ho és encara més, degut a la presència de restes cel·lulars macroscòpiques, les quals han de ser eliminades per continuar aplicant l'esquema de purificació. Això s'aconsegueix gràcies a l'etapa de clarificació.

No existeix una única alternativa per portar a terme aquesta etapa, encara que els processos de centrifugació i microfiltració són els més emprats tant a escala laboratori com a escala industrial.

Per la seva senzillesa, s'opta per la centrifugació en discontinu (Centrífuga JOUAN B4i) en un tub de 50 mL de capacitat. Els paràmetres de centrifugació seleccionats són 2.000 G durant 10 minuts. És possible afegir una segona etapa de clarificació com la microfiltració, malgrat que en aquest cas es decideix no fer-la servir, ja que, com es veurà a continuació, l'etapa d'ultracentrifugació és altament selectiva i no requereix de més etapes prèvies que millorin el seu rendiment.

6.4.4. Captura

La captura de vectors adenovirals en l'estratègia de purificació no escalable es basa en la purificació de les partícules en funció de la seva densitat de flotació (*buoyant density*). La mostra es barreja amb una solució capaç de crear un gradient de densitat quan és sotmesa a

una elevada força centrífuga com la que es genera a l'interior d'una ultracentrífuga. En centrifugar, s'assoleix una situació anomenada d'equilibri en gradient de densitat, on cada component se separa fins a trobar una posició de flotabilitat neutra, és a dir, una posició on la seva densitat de flotació és igual a la de l'entorn. Com a resultat, el procés proporciona una sèrie de bandes discretes, la densitat de les quals creix proporcionalment en funció de la seva proximitat al fons del tub.

Per assolir un bon rendiment de separació mitjançant la ultracentrifugació en gradient de densitat, cal fer una selecció molt acurada de la dissolució emprada per generar-lo, la qual ha de considerar diferents factors: ha d'ésser no tòxica o, al menys, inert amb el material biològic a separar, i ha de facilitar la recollida de les bandes. Dins del ventall de solucions que s'utilitzen destaquen les de sacarosa, la qual permet formar gradients de fins 1,28 g/mL, les de glicerol que poden utilitzar-se a densitats inferiors a 1,15 g/mL i les de clorur de cesi (CsCl) amb un rang de fins a 1,7 g/mL, entre d'altres. El valor de la densitat de flotació dels vectors adenovirals és aproximadament de 1,34 g/mL [1, 15]. Per tant, d'acord amb les alternatives descrites, les dissolucions de clorur de cesi són les òptimes per establir el gradient de densitat.

El procés consisteix en sotmetre la mostra clarificada a dues rondes d'ultracentrifugació consecutives. Per portar a terme la primera ronda, es disposa de la mostra clarificada amb un espectre divers de contaminants (àcids nucleics, proteïnes, etc...) que presenten un rang ampli de densitats. Per tal d'incrementar la capacitat d'eliminar aquestes impureses, es genera un gradient de densitat discontinu amb un rang que abraça dels 1,25 g/mL fins als 1,40 g/mL de clorur de cesi, en dues fases de 10 mL cadascuna. El mètode més àmpliament usat per produir-lo consisteix en carregar inicialment la fase menys densa (1,25 g/mL) en el tub de centrífuga i, posteriorment, introduir la micropipeta al fons del tub i afegir el volum de la fase més densa (1,40 g/mL). D'aquesta manera, s'evita la presència de bombolles d'aire en la interfase que causen discontinuïtats. Un cop establert el gradient, ja es pot addicionar la mostra clarificada (veure Figura 6.4a).

Aquesta barreja s'ultracentrifuga (Ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L90K) a 130.000 G durant 1 hora i 42 minuts. La ultracentrífuga es deixa aturar per la seva pròpia inèrcia, així s'evita el trencament de les bandes formades. El resultat es pot veure a la Figura 6.4b, on es dona l'aparició de les bandes, més o menys definides, que contenen els components presents a la mostra inicial. La banda més densa (II) es troba al fons del tub indicada per una sageta, aquesta conté les partícules adenovirals semipures. Tot seguit, indicada per una clau vertical, s'estén una zona (I) en una posició superior on es troba una àmplia varietat de contaminants de densitat inferior a 1,34 g/mL (agregats proteics tant cel·lulars com vírics, restes d'àcids nucleics, etc...).

Es procedeix a la recol·lecció de la banda de vectors semipurs. El mode de recol·lecció depèn del tipus de tub emprat i de la distribució de les partícules en el gradient. Es poden utilitzar xeringues, pipetes Pasteur o, fins i tot, bombes peristàltiques si el sistema és molt complex. En aquest cas concret, com que s'utilitzen tubs de material plàstic, es procedeix a fer una

punció en el lateral del tub amb un xeringa a l'interior de la cabina de flux laminar i s'extreu la banda de producte semipur amb un volum de 6 mL.

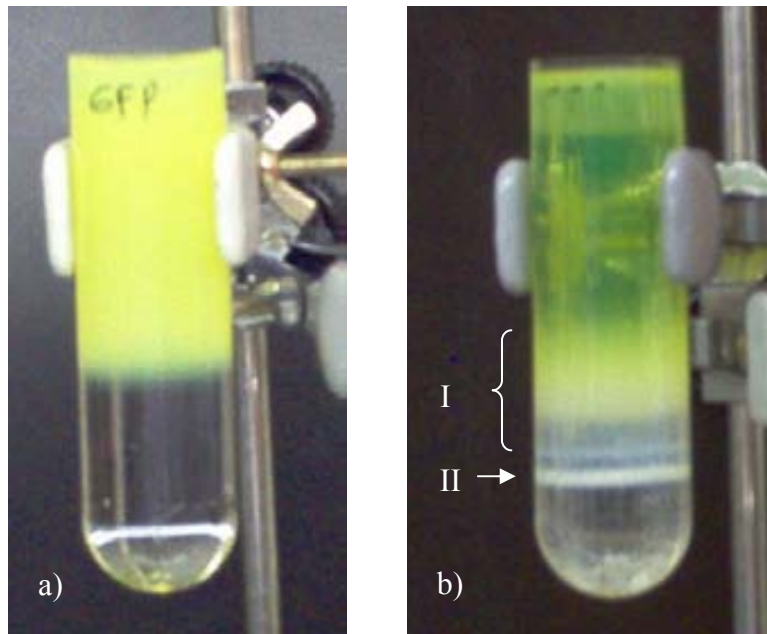


Figura 6.4. Imatges del procés de captura dels vectors adenovirals: a) Mostra inicial; b) Resultat de la primera ronda d'ultracentrifugació en gradient de densitat discontinu: (I) zona de contaminants, (II) banda de virions semipurs.

L'objectiu de la segona ronda d'ultracentrifugació és la captura molt més acurada dels vectors. Per això, aquesta es realitza en un gradient continu i isopícnic (de densitat constant) de 1,34 g/mL de clorur de cesi. Es barreja la banda anteriorment obtinguda amb 5 mL de solució de clorur de cesi en un tub de centrifuga de menor volum, i s'ultracentrifuga a 155.000 G durant 18 h. La ultracentrífuga es deixar aturar per la seva pròpia inèrcia, i així s'evita el trencament de les bandes formades. El resultat es pot observar a la Figura 6.5.

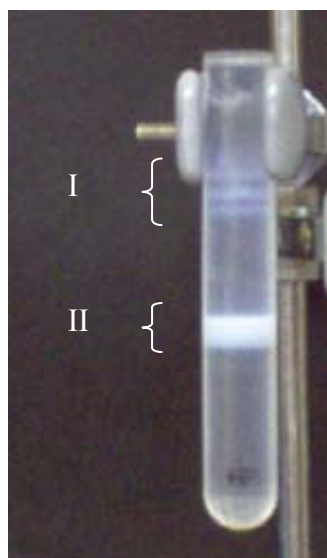


Figura 6.5. Imatge del resultat de la segona ronda d'ultracentrifugació en gradient de densitat continu: (I) zona de contaminants de menor densitat (Virions immadurs), (II) banda de virions purs.

Es distingeixen perfectament quatre estrats, els quals s'agrupen en dues zones. La zona de major densitat (II) conté un volum de 2,5 mL, i agrupa els virions madurs amb una densitat de 1,34 g/mL i un elevat grau de puresa. En canvi, a la zona de menor densitat (I) es poden identificar fins a tres bandes discretes. Diversos autors han analitzat el contingut d'aquests estrats i tots ells coincideixen en la inexistència total o la presència en un grau ínfim de DNA en les esmentades bandes [16-18]. En concret, han estat definides com a partícules incompletes, intermediaris lleugers, bandes superiors, components superiors o càpsides buides [19].

Les càpsides buides són virions immadurs, essencialment no infectius [18], amb una densitat de flotació aproximadament entre 1,29 g/mL i 1,30 g/mL, els quals contenen els components proteics de la càpside (proteïnes II, III, IV), però al seu interior són defectius en la presència de DNA viral i les proteïnes associades a aquest (proteïnes V i VII) [16, 17, 20]. Òbviament, a aquestes partícules els manca la capacitat d'alliberar el gen terapèutic, no obstant, les proteïnes que les conformen poden provocar efectes tòxics a altes concentracions i augmentar la resposta immunològica [21]; per aquesta raó és necessària la seva reducció al mínim.

En aquest punt, cal recordar que el cicle de replicació de l'adenovirus és altament complex i hi intervenen múltiples etapes. Aquest fet provoca la generació de diverses partícules víriques immadures abans de l'obtenció de la partícula vírica final [22], i explica la presència de diverses bandes a la zona I de la Figura 6.5. Malgrat que el temps de recollida durant la producció es determina per assegurar que la majoria dels virus siguin madurs, és inevitable que molts virions es trobin en diferents etapes del cicle de replicació.

6.4.5. Polit

L'etapa de polit en l'estratègia de purificació no escalable té com a objectiu fonamental l'eliminació de l'ió Cs^+ de la mostra pura, el qual esdevé altament tòxic en solució. Per la seva senzillesa i capacitat d'eliminar partícules en funció de la mida, la cromatografia d'exclusió molecular, la qual s'explica en més profunditat en l'estratègia escalable, és l'operació bàsica escollida per portar a terme aquesta etapa.

L'escala reduïda per a la qual es troba dissenyada aquesta estratègia no escalable permet realitzar la cromatografia per gravetat amb columna oberta. La columna d'un sol ús utilitzada és l'anomenada PD-10 (GE Healthcare) dissenyada per a l'eliminació de sal de les mostres, i proporciona un volum de llit de 8,5 mL. Es troba preberlerta amb la reïna Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare). Aquesta reïna, formada per partícules de dextrà, presenta un límit d'exclusió de 5 kDa [23], molt baix i, com a conseqüència, extremadament selectiu per assegurar la separació total de l'ió Cs^+ i la recuperació quantitativa del virió. Precisament, un inconvenient molt important de l'estratègia radica en validar la total eliminació de traces d'aquest ió en la mostra finalment purificada [24].

Es carrega el volum de virus pur procedent de la segona ronda d'ultracentrifugació (2,5 mL) i es procedeix a addicionar volums successius de 0.5 mL de solució PBS, mentre es van

obtenint una sèrie de fraccions discontinües. El mètode es troba optimitzat empíricament, i el producte es recull en les fraccions que se succeeixen de la 3 a la 7 (ambdues incloses), en 2,5 mL de volum total.

Amb l'objectiu únicament de comparar els paràmetres globals de purificació obtinguts amb l'estratègia escalable, no és necessari realitzar un tractament exhaustiu de les mostres obtingudes a cadascuna de les etapes que conformen l'estratègia no escalable. De manera que es decideix analitzar únicament les mostres inicial i final del procés. Així, els resultats del rendiment de recuperació del vector adenoviral es poden observar a la Taula 6.1.

Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Sobrenedant inicial	225	3,70	8,34	100,0
Fracció virus (Polit)	2,5	40,20	1,00	12,0

Taula 6.1. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de polit.

El rendiment de recuperació és del 12,0%. Com s'ha dit, la manca d'anàlisi de les etapes intermèdies no permet conèixer amb seguretat quina és l'operació que provoca aquesta pèrdua substancial d'infectivitat. No obstant, tal i com es veurà en l'estratègia escalable, les etapes de lisi cel·lular, clarificació i polit presenten un rendiment elevat; de manera que l'operació bàsica que més afectaria el rendiment seria la ultracentrifugació, degut al període de temps tan elevat durant el qual el virus es troba sotmès a intenses forces centrífuges.

A la Taula 6.2, es mostra l'elevat rendiment d'eliminació de més del 99% d'un dels principals contaminants presents al llarg del procés: els agregats proteics.

Mostra	Volum (mL)	Concentració ($\mu\text{g/mL}$)	Total (mg)	Eliminació (%)
Sobrenedant inicial	225	1.875,5	422	0,0
Fracció virus (Polit)	2,5	780	1,95	99,5

Taula 6.2. Resultat de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de polit.

Aquest fet ja posa de manifest l'especificitat que presenta aquesta estratègia per proveir de vectors adenovirals amb un elevat grau de puresa, la qual s'analitzarà a l'apartat 6.7.

6.4.6. Taula de purificació

Els valors procedents dels rendiments de recuperació vírica i d'eliminació de contaminants de les etapes anteriorment avaluades es recopilen per confeccionar la taula global de purificació de l'estratègia no escalable, la qual es mostra a la Taula 6.3.

A partir dels factors de concentració i dels rendiments obtinguts experimentalment és possible recalculer els valors absoluts de volum, títol víric i concentració de proteïnes per a una suposada escala de 10 L de la qual partia el material tractat. De fet, els valors absoluts recalculats (per exemple, el de títol víric) són comparables als determinats experimentalment.

Etapa	Volum (mL)	Títol víric (10^{10} UI/mL)	Proteïna (mg/mL)	Activitat específica del virus (10^{10} UI/mg proteïna)
Cultiu cel·lular	10.000	4,30	1,88	2,29
Lisi cel·lular Clarificació Captura Polit	111	46,40	0,84	55,20

Etapa	Factor de concentració (X)	Recuperació de virus (%)	Eliminació de proteïna (%)	Factor de purificació (X)
Cultiu cel·lular	1,0	100,0	0,0	1,0
Lisi cel·lular Clarificació Captura Polit	90,0	12,1	99,5	24,1
Global	90,0	12,1	99,5	24,1

Taula 6.3. Taula de purificació: estratègia no escalable.

Tanmateix, cal deixar molt clar que, en aquest cas, la taula de purificació esdevé més un exercici teòric que no pas real, ja que l'estratègia no escalable difícilment podrà tractar 10 L de cultiu cel·lular en un únic procés. Tot i això, serveix per mostrar les dades conjuntes del procés i comparar, fins a cert punt, amb la següent aproximació.

Entre els paràmetres que es mostren, destaca l'activitat específica del virus, calculada com el quocient entre el títol víric i la concentració de proteïna. Aquesta proporciona una idea de la puresa que va adquirint la mostra tractada a mesura que avança el procés de purificació, ja que a cada nova operació, la concentració de proteïnes disminueix i el títol víric augmenta fins als valors característics del material pur. El seu valor final és de $55,20 \cdot 10^{10}$ UI/mg proteïna. Relacionat amb aquest paràmetre es troba el factor de concentració, calculat com el quocient entre l'activitat específica de l'etapa actual i de l'anterior. Aquelles etapes de l'estratègia que proporcionen un valor superior a 1, indiquen que hi ha hagut una millora en el grau de puresa del producte. El valor global del factor és de 24,1.

Finalment, comentar el valor global del factor de concentració que és de 90 vegades. Un valor molt elevat, ja que teòricament permetria reduir els 10 L inicials fins a 111 mL després de l'etapa de polit.

6.5. Estratègia escalable

En funció d'una anàlisi de la bibliografia publicada [25-27], es proposa la següent estratègia escalable integrada per les etapes que es mostren a la Figura 6.6. Les característiques i la definició de cadascuna d'elles es discuteix en els pròxims apartats, valorant en cada cas les alternatives existents.

Les primeres etapes de la secció de purificació inicial són molt similars a les portades a terme en l'estratègia anterior: recollida de la fracció de cultiu més rica en partícules adenovirals per ésser posteriorment tractada; lisi cel·lular per alliberar el producte i, tot seguit, eliminació de les restes cel·lulars macroscòpiques mitjançant el procés de clarificació. Finalment, cal concentrar l'efluent obtingut per reduir-ne el volum a tractar.

Posteriorment, degut a les característiques del procés, són necessàries dues operacions auxiliars. D'una banda, per tal d'eliminar contaminants molt perjudicials per al procés, com són els àcids nucleics, és imprescindible una etapa de tractament enzimàtic i, d'altra banda, cal una etapa de condicionament previ a la secció de purificació intermèdia.

Les seccions de purificació intermèdia i final són monopolitzades per la presència de la cromatografia com a tècnica principal. Arrel de l'ampli espectre de mètodes cromatogràfics existents i per tal de minimitzar el nombre de passos de l'estratègia escalable, diversos autors han plantejat la possibilitat de combinar les dues seccions en un únic tipus de cromatografia que aconseguís la captura i el polit dels vectors [9, 28]. No obstant, el grau de puresa obtingut no satisfà els estàndards necessaris per a l'administració *in vivo* [29], de manera que són necessàries com a mínim dues etapes cromatogràfiques, una a cada secció de purificació,

preferiblement que utilitzin principis de separació diferents [30].

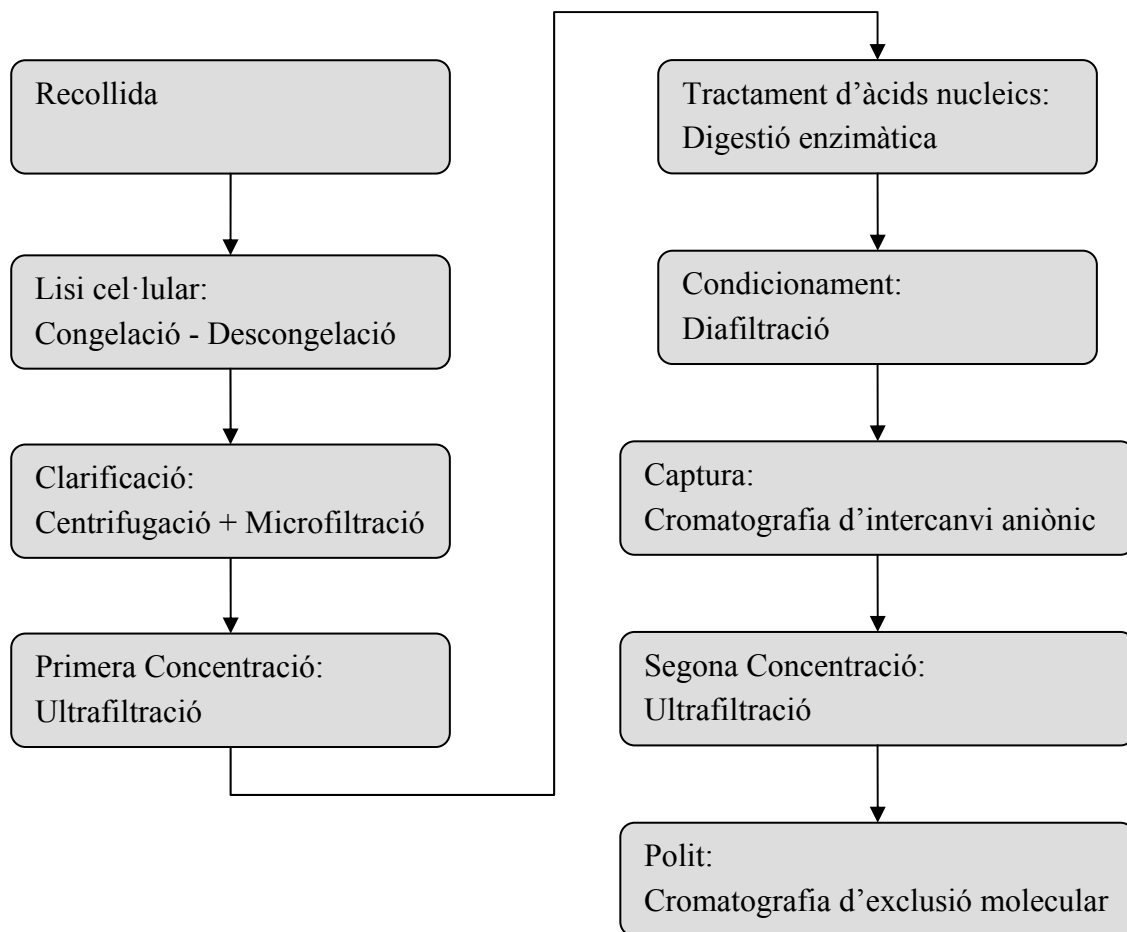


Figura 6.6. Etapes de l'estratègia de purificació escalable de vectors adenovirals.

A la Taula 6.4, es resumeixen els principals mètodes cromatogràfics emprats en la separació de vectors adenovirals en l'actualitat [30]. D'entre les alternatives avaluades com a etapa de captura destaca la utilització generalitzada de la cromatografia de bescanvi iònic. Huyghe i col. van ésser els primers en certificar el seu potencial i, en l'actualitat, la gran majoria de processos industrials de purificació de vectors adenovirals la usen com a etapa de purificació intermèdia [12, 27] (veure Taula 2.5 de la introducció). D'altra banda, per la seva senzillesa i baix cost econòmic, la cromatografia d'exclusió molecular és la cromatografia per excel·lència destinada a la secció de purificació final. La selecció d'aquesta tècnica i les seves característiques inherents requereixen una operació auxiliar de concentració integrada entre les dues seccions de purificació, tal i com es discutirà a l'apartat 6.5.8.

La resta de mètodes cromatogràfics existents resulten menys freqüents i proporcionen, en general, rendiments globals inferiors que no poden competir amb les alternatives mencionades a escala industrial [30].

Cromatografia	Tipus d'etapa	Reïna	Tampó/pH	Elució	Rendiment (%)
Intercanvi Iònic (Intercanviador Aniònic)	Captura + Polit	Fractogel DEAE	50 mM Tris-HCl pH 8,0	NaCl	60 -80
	Captura	Q Sepharose XL	20 mM Tris-HCl pH 8,0	NaCl	81
	Polit	Source Q15	20 mM Tris-HCl pH 8,0	NaCl	-
	Captura	Fractogel DEAE	50 mM fosfat pH 7,5	NaCl	-
	Captura	Fractogel DEAE	50 mM Tris-HCl pH 8,0	NaCl	75 – 90
	Captura	Fractogel DEAE	50 mM HEPES pH 7,5	NaCl	60 – 80
	Captura + Polit	Source Q15	50 mM HEPES pH 7,5	NaCl	97 ± 9
	Captura	Steamline Q XL	-	-	
	Captura	Steamline Q XL	10 mM Tris-HCl pH 8,0	NaCl	45 -65
Intercanvi Iònic (Hidroxiapatita)	Polit	Macroprep ceramic hydroxyapatite	50 Mm HEPES pH 7,5	Fosfat	71
Exclusió Molecular	Captura + Polit	Toyopearl HW-75F	PBS pH 7,5	-	15 – 20
	Polit	Superdex 200	50 mM fosfat pH 7,5		-
	Polit	Sephacryl S-400HR	50 Mm HEPES pH7,5		> 90
	Polit	Sephacryl S-500	10 mM Tris-HCl pH 8,0		-
	Polit	Sephacryl S-400HR	-		-
Afinitat	Captura + Polit	TosoHass chelate zinc	50 mM HEPES pH 7,5	Glicina	49 – 65
Fase Reversa	Polit	Polyflo	10% 2-PrOH en PBS 7,4	Mode negatiu	94 – 97
Interacció Hidrofòbica	Captura + Polit	Toyopearl butyl o phenyl	50 mM Tris-HCl pH 8,0	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 – 30
	Captura + Polit	Fractogel propyl	50 mM Tris-HCl pH 8,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	-

Taula 6.4. Principals mètodes de cromatografia per a la purificació de l'adenovirus serotipus 5 [30].

6.5.1. Recollida

D'acord amb les explicacions realitzades a l'apartat 6.4.1, es podria recollir una nova fracció de virions intracel·lular per iniciar la nova estratègia. Tanmateix, la major part de companyies amb processos industrials de purificació de vectors adenovirals (veure Taula 2.5 de la introducció) utilitzen tant la fracció vírica del sobrenedant com l'associada a l'interior de les cèl·lules per al seu tractament, donat que els equips que conformen l'estratègia escalable ho poden permetre. D'aquesta manera, s'elimina una pèrdua inicial de producte, la qual ja s'anirà produint progressivament durant les següents etapes.

És per això que es decideix tractar directament el brou de cultiu contingut en el bioreactor, en finalitzar la producció.

6.5.2. Lisi cel·lular

De manera anàloga a l'anterior estratègia, cal alliberar el producte de l'interior de la cèl·lula mitjançant el seu trencament. Atenent els diferents avantatges i desavantatges de les possibles alternatives, descrites a l'apartat 6.4.2, i aprofitant la flexibilitat d'operació de la cambra de cultiu del bioreactor no convencional, s'opta per seguir el procediment de congelació i descongelació per triplicat. En conjunt, per tractar el volum de producció íntegre, cadascun dels cicles dura una hora, per accelerar el procés i homogeneïtzar al màxim el contingut de la bossa de cultiu, aquesta s'agita puntualment.

6.5.3. Clarificació

Com s'ha comentat en l'apartat 6.4.3, el processos de centrifugació i microfiltració no són operacions excloents. De fet, en el present estudi, s'opta per combinar-los ambdós, en un intent d'assegurar la completa eliminació de restes cel·lulars i de millorar el rendiment en les etapes posteriors d'ultrafiltració i cromatografia, malgrat que existeix la possibilitat d'aplicar únicament un mètode de separació dels dos anteriorment citats per assolir un grau de clarificació acceptable [15].

La primera operació consisteix en la centrifugació en discontinu del brou lisat. Aquesta tècnica és apropiada per clarificar volums de lisat de l'ordre de litres, l'únic inconvenient radica en el fet de mantenir les condicions d'esterilitat. Per a volums superiors, cal considerar la centrifugació en continu; en aquest cas, també és particularment important evitar la possible formació d'aerosols infectius que pugui posar en perill els operaris [12]. Referent a les condicions d'operació, la pèrdua de virus dependrà del temps i de la força centrífuga relativa (RCF) a la qual se sotmeti el lisat. Estudis publicats indiquen que comença a observar-se una pèrdua significativa del percentatge de recuperació a partir d'una RCF igual a 3.000 G aplicada durant 5 minuts [1]. A l'hora de fixar les condicions d'operació, també és necessari considerar el coeficient de sedimentació de l'adenovirus de $4,42 \cdot 10^{-5}$ mm/(g·min) [7]. Aquest reduït valor indica que el virus migrat del sí del fluid i atrapat en el pèl·let durant la centrifugació serà menyspreable en tubs de centrífuga que continguin volums de l'ordre de

litres, com és el cas. Per tractar, doncs la totalitat del contingut del bioreactor es realitzen 4 cicles de centrifugació discontinua (Centrífuga BECKMAN J2-21 M/E) en 5 tubs de 0,5 L de capacitat. Els paràmetres de centrifugació seleccionats són RCF de 2.000 G durant 10 minuts.

Un cop obtingut el sobrenedant, s'aplica la microfiltració. Aquest mètode de separació permet l'aïllament en solució, gràcies a la seva mida, de partícules insolubles en circular a través d'una membrana de porus homogènia per acció de la pressió transmembrana (TMP) com a força impulsora. Només fluïran el dissolvent i les partícules amb una mida inferior al porus, en concret, el rang de separació d'aquestes oscil·la entre 0,05 µm i 5 µm [31]. Els filtres emprats en aquest procediment presenten dos possibles modes d'operació: flux normal i flux tangencial (veure Figura 6.7).

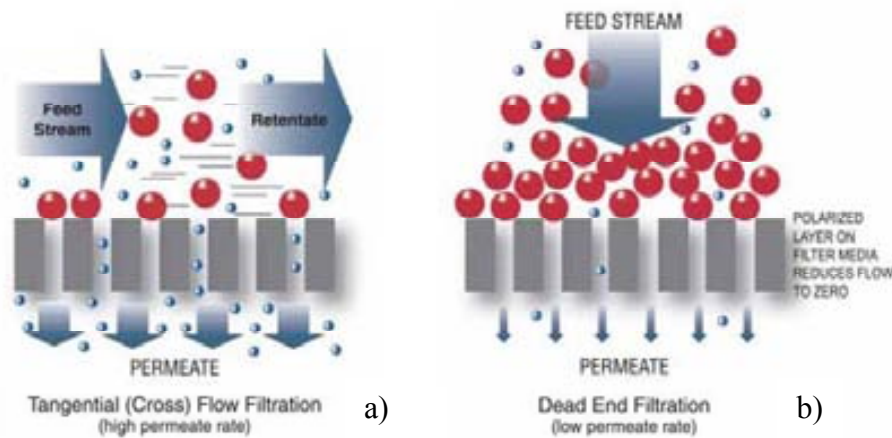


Figura 6.7. Esquemes dels modes de microfiltració: a) flux tangencial; b) flux normal [31].

Durant la microfiltració amb flux tangencial, el corrent d'aliment es desplaça paral·lel a la superfície de la membrana i el fluid que la traspasa, denominat corrent de filtrat o permeat, ho fa de manera perpendicular. Les partícules queden retingudes en funció de la mida del porus i són arrossegades contínuament pel flux paral·lel, donant lloc a l'anomenat corrent de retingut o concentrat. Això permet allargar la vida del filtre i evitar possibles obturacions de la membrana. En aquest cas, la TMP es pot calcular com:

$$TMP_{\text{tangencial}} = \frac{P_{\text{entrada}} - P_{\text{sortida}}}{2} - P_{\text{permeat}}$$

Equació 6.1. Expressió de la pressió transmembrana per al flux tangencial ($TMP_{\text{tangencial}}$), on: P_{entrada} és la pressió d'entrada al filtre, P_{sortida} és la pressió de sortida del filtre, P_{permeat} és la pressió del permeat.

En canvi, durant la microfiltració amb flux normal, tant el corrent d'aliment com el de permeat circulen perpendicularment a la superfície de la membrana. No existeix corrent de retingut, sinó que les partícules retingudes al filtre donen lloc al pastís de filtració, el qual provoca l'augment de la pressió en el filtre i la consegüent disminució del flux al llarg de l'operació fins a la total obturació de la membrana. En aquest cas, la TMP es pot calcular com:

$$TMP_{normal} = P_{entrada} - P_{sortida}$$

Equació 6.2. Expressió de la pressió transmembrana per al flux normal (TMP_{normal}), on: $P_{entrada}$ és la pressió d'entrada al filtre, $P_{sortida}$ és la pressió de sortida del filtre (pressió de permeat).

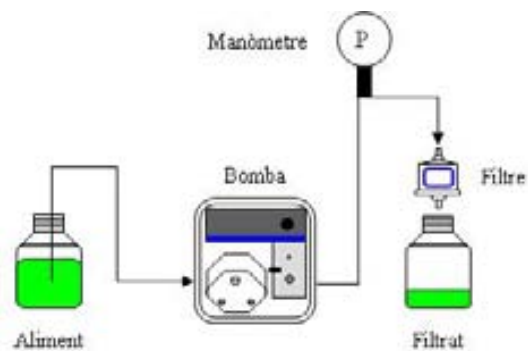
La microfiltració tangencial es troba indicada en aquells casos on el corrent d'aliment conté un alt contingut en sòlids i, per tant, s'aplica en molts esquemes com a única etapa de clarificació. En la present configuració i donada la presència de la subetapa prèvia de centrifugació, la qual elimina la pràctica totalitat de sòlids, s'escull un filtre que opera en mode de flux normal.

Les configuracions més esteses dels filtres que operen en mode de flux normal són el filtre premsa (*plate & frame filter*) i el filtre plegat (*pleated filter*), ambdós basats en la presència de làmines planes a través de les quals circula el flux. Mentre que el primer pel seu disseny i complexitat operacional s'utilitza a la indústria biotecnològica només de gran escala (per exemple, en la producció d'antibiòtics o d'àcid làctic), la segona configuració resulta molt més atractiva per a aquests processos, raó per la qual s'escull en aquest treball. Els plecs de la membrana proporcionen una àrea de filtració elevada, en unitats compactes en forma de càpsula prèviament esterilitzades i preparades per ésser utilitzades.

Per verificar la reproductibilitat de la clarificació, es decideixen realitzar dos processos de microfiltració totalment independents, sense reaprofitar la càpsula de filtració, per tractar alíquotes d'aproximadament 2 L i 3 L. El muntatge experimental emprat es pot observar a la Figura 6.8. El procés es realitza a l'interior de la cabina de flux BIO IIA (Telstar), on la bomba peristàltica Masterflex L/S (Cole Parmer) impulsa el fluid cap a la unitat de microfiltració; un manòmetre estàndard situat al tram d'impulsió del circuit indica la pressió durant la microfiltració per anticipar la possible obturació del filtre.



a)



b)

Figura 6.8. a) Muntatge experimental utilitzat en la microfiltració; b) Esquema del muntatge.

Considerant l'escala del procés i seguint els criteris establerts pel fabricant, s'aconsella emprar un temps de filtrat entre 1 h i 2 h [32]. En concret, es decideix fixar un valor de 1 h, el qual també és prou reduït com per no perjudicar l'estabilitat dels virions. Aquest valor determina el flux que impulsa la bomba, que en ambdós casos es fixa gradualment fins als 50 mL/min. D'altra banda, el volum a tractar, els temps de processat i la presència d'una subetapa prèvia de clarificació fixen les característiques principals del filtre a utilitzar. En el cas d'estudi, s'utilitza una càpsula de filtre plegat d'un sol ús ULTA Cap PP (GE Healthcare) amb un diàmetre de porus de 0,6 μm i una àrea disponible de 400 cm^2 (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.6.1 del capítol de materials i mètodes).

Els resultats dels experiments de microfiltració sobre les dues alíquotes es mostren a la Figura 6.9. En aquesta es representa, d'una banda, el flux de permeat respecte l'àrea disponible, en LMH ($L/(m^2_{membrana} \cdot h)$), i la pressió transmembrana (barg) front al temps d'operació.

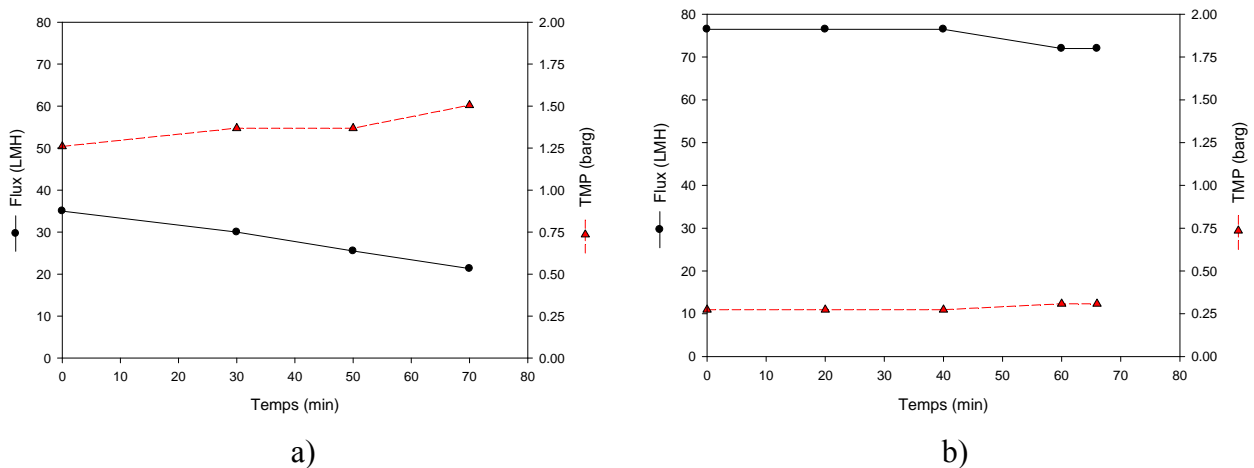


Figura 6.9. Perfils de flux (●) i de pressió (▲) durant el procés de microfiltració: a) alíquota 2 L; b) alíquota 3 L.

La tendència general en ambdós processos és d'augment de la pressió, mentre el flux disminueix progressivament a mesura que el filtre va perdent capacitat. No obstant, comparant les representacions, existeix una diferència significativa en els experiments, observada en el comportament de les corbes tant de flux com de pressió.

Així, a la Figura 6.9a, el flux de permeat varia dels aproximadament 35 LMH en el temps inicial fins als 20 LMH al final de l'operació; mentre que la pressió augmenta fins a 1,5 barg. En canvi, a la Figura 6.9b tot i tractar-se un volum superior i que el temps d'operació global és de 66 minuts, pràcticament el mateix que en el cas anterior; el flux de permeat és manté pràcticament constant en aproximadament 75 LMH al llarg de l'operació, mentre la pressió transmembrana observada en el manòmetre arriba lleugerament per sobre dels 0,25 barg (6 vegades per sota que a la Figura 6.9a). La diferència de comportament en els dos assajos pot indicar algun tipus de deficiència inespecífica prèvia en la membrana del primer filtre emprat, o bé la presència d'aire atrapat en el circuit, degut a una purga insuficient del mateix.

En referència al rendiment de recuperació del vector adenoviral al llarg de la clarificació, els resultats es troben recollits a la Taula 6.5 a continuació.

Primer experiment (2 L)				
Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Sobrenedant	2.232	2,06	45,98	100,0
Clarificat	2.277	2,14	48,73	105,9
Segon experiment (3 L)				
Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Sobrenedant	3.166	6,07	192,17	100,0
Clarificat	3.234	5,92	191,45	99,6

Taula 6.5. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de clarificació.

Un primer aspecte, a priori inesperat, que s'adverteix en ambdós experiments és el lleuger augment del volum de clarificat respecte el de sobrenedant, degut a la presència de restes d'aigua MilliQ a l'interior del filtre després del seu condicionament previ.

Pel que fa al percentatge de recuperació vírica mitjà, aquest és de $102,8 \pm 3,4\%$ ($n = 2$), un valor que indicaria que al material clarificat, el títol víric és lleugerament superior a l'inicial. Tenint en compte que els valors de recuperació per separat de les dues iteracions es troben per sobre i per sota del 100%, es considera que les pèrdues de virus durant aquesta etapa són nul·les i la recuperació mitja és del 100%. Tanmateix i encara que no es demostra en aquest treball, Segura i col. publiquen un fenomen de rendiment superior al 100% durant una etapa de filtració a la purificació d'un vector retroviral, i assenyalen com a possible causa la neutralització de contaminants que interfereixen amb les partícules adenovirals i afecten la tècnica de titulació amb una sotaestimació del títol víric real [33].

A la Taula 6.6 i la Taula 6.7 es mostren els rendiments d'eliminació dels dos principals contaminants presents al llarg del procés: els agregats proteics i el DNA.

Primer experiment (2 L)				
Mostra	Volum (mL)	Concentració ($\mu\text{g/mL}$)	Total (mg)	Eliminació (%)
Sobrenedant	2.232	1.875,5	4.186,1	0,00
Clarificat	2.277	1.658,5	3.776,5	9,78
Segon experiment (3 L)				
Mostra	Volum (mL)	Concentració ($\mu\text{g/mL}$)	Total (mg)	Eliminació (%)
Sobrenedant	3.166	1.799,0	5.695,6	0,00
Clarificat	3.234	1.620,0	5.239,1	8,01

Taula 6.6. Resultat de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de clarificació.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (ng/mL)	Total (µg)	Eliminació (%)
Sobrenedant	3.166	18.190	57.589,54	0,00
Clarificat	3.234	16.449	53.196,07	7,63

Taula 6.7. Resultat de l'anàlisi de DNA després del procés de clarificació (segon experiment (3 L)).

El rendiment mitjà d'eliminació de proteïna total durant l'etapa de clarificació és d'un $8,94 \pm 5\%$ ($n = 2$). Pel seu pes molecular, pràcticament la totalitat de les proteïnes travessen els porus del filtre i això provoca la baixa disminució de proteïnes al clarificat; aquelles retingudes queden adsorbides al filtre o bé a les restes cel·lulars que aquest pugui eliminar.

La mateixa explicació és aplicable per al cas del DNA ($7,63 \pm 1\%$), ja que la seva mida pot ésser, fins i tot, inferior al de certes proteïnes.

6.5.4. Concentració

Un cop superada la clarificació, es disposa d'un volum a tractar on els virions es troben molt diluïts. Per tal de concentrar-lo, minimitzar les dimensions de l'equip implicat en les següents etapes del procés i reduir-ne el cost global, així com el temps de tractament invertit, es fa necessària la reducció del volum sense perjudicar la infectivitat del producte i, si és possible, maximitzant l'eliminació de contaminants.

La concentració pot ser assolida per diverses vies. Una d'aquestes alternatives es basa en la precipitació o extracció del virus i en la posterior redissolució en un volum inferior a l'inicial; aquesta alternativa, però, no s'aplica a escala productiva. En canvi, la tècnica de concentració més comuna és la ultrafiltració (veure Taula 2.5 de la introducció).

La ultrafiltració, a diferència de la microfiltració, es basa en la separació de components solubles en funció de la seva mida a nivell molecular, gràcies al seu pas a través d'una membrana d'estructura anisotròpica, però amb una distribució de mida de porus altament controlada. La classificació de les membranes per a tal fi no es realitza en funció del diàmetre de porus, sinó d'acord amb el pes molecular de les partícules retingudes de mida similar als mateixos. Aquest paràmetre és l'anomenat tall nominal de pes molecular (NMWC), les unitats del qual són Daltons (Da, pes d'un àtom d'hidrogen). S'estableix, per definició, el NMWC com el pes molecular d'una proteïna globular no carregada, la qual és retinguda en un 90% per la membrana d'ultrafiltració. Cal tenir molt present que la morfologia i càrrega de les partícules separades per ultrafiltració també poden tenir un efecte directe sobre la capacitat per ésser retingudes: una partícula amb morfologia fibrosa pot travessar el porus de la membrana, mentre que una partícula globular del mateix pes molecular pot quedar retinguda. Els valors de NMWC emprats en la concentració de vectors adenovirals varien entre 100 kDa i 1.000 kDa, en funció del grau de retenció exigint per al virus i per a l'eliminació dels contaminants [34]. Els filtres d'ultrafiltració operen, majoritàriament, en mode de flux tangencial; fet que permet reduir el fenomen de polarització per concentració que té lloc a la superfície de la membrana (veure Figura 6.10).

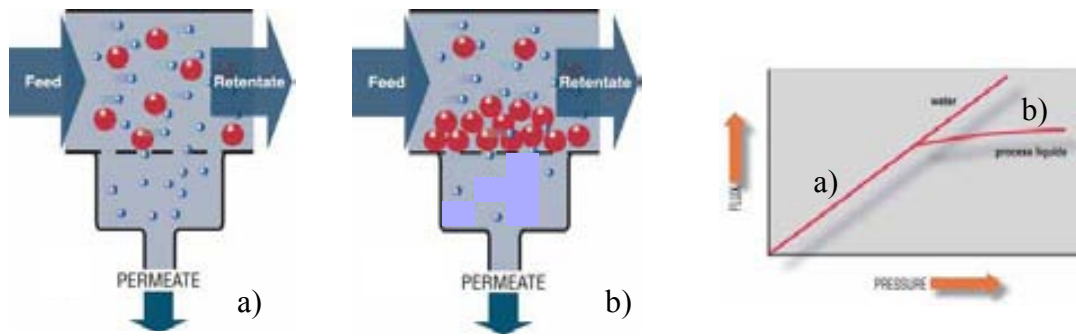


Figura 6.10. Fenomen de polarització per concentració: a) condicions d'operació no limitades b) condicions d'operació limitades.

Aquest fenomen es dona en augmentar la pressió transmembrana i consisteix en la formació d'una pel·lícula de partícules acumulades a la superfície de la membrana, anomenada capa de gel que augmenta la resistència al flux fins a limitar-lo i mantenir-lo constant, malgrat continuï augmentant la pressió. La polarització per concentració succeeix, fins i tot, sense obturació física dels porus de la membrana. Cal posar especial atenció, doncs, a minimitzar aquesta capa, ja que pot afavorir l'agregació de l'adenovirus i, per tant, la consegüent pèrdua de rendiment.

Les configuracions més esteses dels filtres que operen en mode de flux tangencial són el filtre en espiral (*spiral wound*) i el filtre de fibres buides (*hollow fiber*). El *spiral wound* consisteix en un eix cilíndric metàl·lic porós envoltat per la membrana i s'utilitza en aplicacions de tractament d'aigua. Com s'ha vist en el capítol anterior, el *hollow fiber* es compon d'una membrana conformada per un feix de diminutes fibres circulars de diàmetre intern i longitud variables agrupades a l'interior d'una carcassa. Aquesta configuració permet una àrea de filtració molt elevada en dispositius compactes, fàcilment escalables i amb un cost econòmic assumible, la qual cosa fa de la ultrafiltració amb filtre de fibres buides l'opció preferent per a l'etapa de concentració en el present treball.

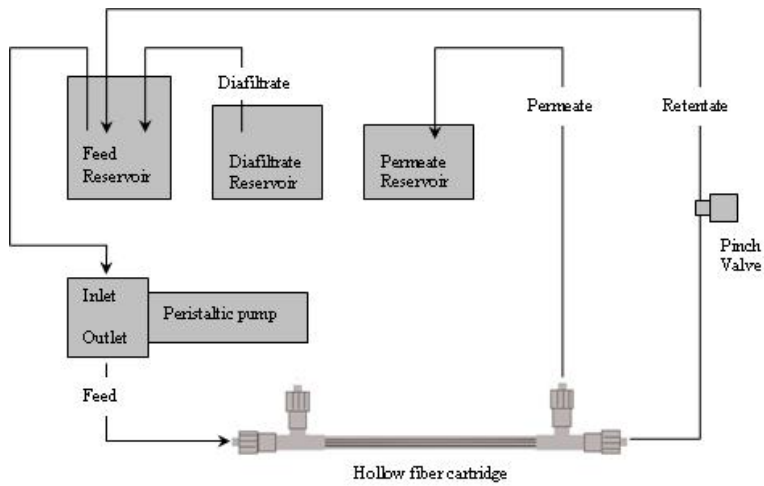
L'objectiu d'aquesta etapa de concentració és la reducció, com a mínim, de 10 vegades del volum de material purificat fins al moment. La possibilitat de disposar de dos equips d'ultrafiltració amb diferents rangs d'operació permet realitzar un estudi, no només de reproductibilitat de les dades, sinó a més d'escalabilitat de la tecnologia aplicada a la recuperació de les partícules adenovirals i a l'eliminació dels contaminants.

6.5.4.1. Estudi d'escalabilitat

Les unitats emprades, les quals es mostren a la Figura 6.11 i la Figura 6.12, són el sistema Midjet Advanced i el sistema Quixstand (ambdós de GE Healthcare). El primer es troba dissenyat per al tractament de volums a petita escala, de fins a 200 mL; el segon sistema pot assolir un rang d'operació des de 0.2 L fins a 2 L (veure apartat 9.6.2 del capítol de materials i mètodes). De manera que existeix un factor d'escalabilitat de 10 vegades entre els dos.



a)

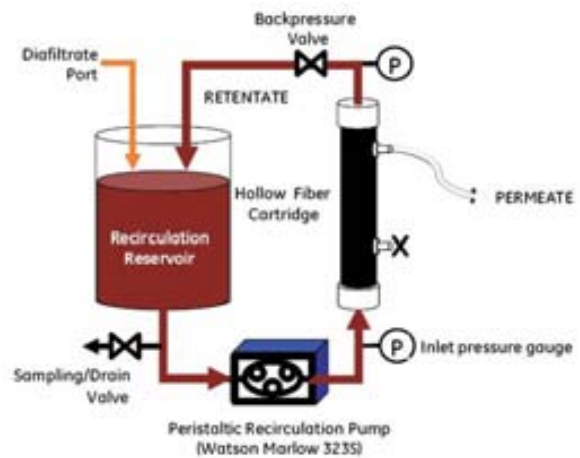


b)

Figura 6.11. a) Muntatge experimental utilitzat en la concentració a petita escala Midjet Advanced System, la sageta indica el filtre d'ultrafiltració de fibres buides; b) Esquema del muntatge [35].



a)



b)

Figura 6.12. a) Muntatge experimental utilitzat en la concentració a mitjana escala Quixstand, la sageta indica el filtre d'ultrafiltració de fibres buides; b) Esquema del muntatge [36].

El principi d'operació és idèntic per a ambdós sistemes: una bomba peristàltica manté en recirculació la solució a concentrar fent-la arribar al *hollow fiber* des del tanc d'alimentació. Del fluid que accedeix al filtre se n'obtenen dues fraccions, el permeat que es retira cap a un reservori extern i el retingut que retorna cap al tanc d'aliment. És possible modificar el flux de permeat, gràcies a l'acció d'una vàlvula de pinçament que modifica el cabal de recirculació i, per consegüent, la pressió dins del *hollow fiber*. Dos manòmetres, a l'entrada i sortida del filtre, indiquen com evoluciona la pressió del procés.

El primer experiment concentra una alíquota líquida de 198 mL, per tant, l'etapa es realitza emprant el sistema de petita escala Midjet, amb un *hollow fiber* d'ultrafiltració tipus MidGee (GE Healthcare) de 16 cm² d'àrea i 100 kDa NMWC, aquest tall nominal de pes molecular tracta d'assegurar la màxima presència de les partícules víriques en el retingut per augmentar el rendiment de l'operació.

Amb l'objectiu de reduir el temps de l'operació, cal maximitzar el flux de permeat, mitjançant el tancament de la vàlvula de pinçament. Com a conseqüència, s'obté una corba que relaciona la TMP i el flux (veure Figura 6.13a). En aquesta representació, es pot observar el fenomen de polarització per concentració, anteriorment descrit. Les condicions d'operació de l'experiment es fixen, doncs, com aquella pressió transmembrana més pròxima a l'inici de la polarització per concentració que manté el flux de permeat més elevat. En aquest cas, se seleccionen 2,1 barg de pressió que proporcionen un flux de 64 LMH.

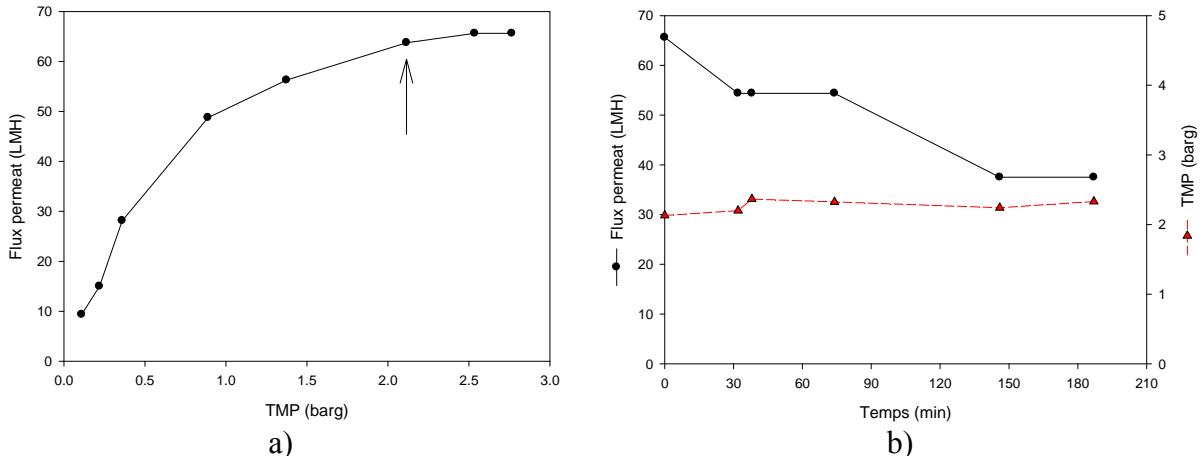


Figura 6.13. Caracterització del procés d'ultrafiltració a petita escala (Midjet): a) Perfil per determinar les condicions operacionals, la sageta indica les condicions seleccionades; b) Perfils d'operació, flux de permeat (●) i de pressió transmembrana (▲) durant l'etapa.

A la Figura 6.13b, es mostra l'evolució de la ultrafiltració un cop fixades les condicions inicials; el temps total d'operació és de 186 minuts. De manera anàloga als perfils de microfiltració, el flux de permeat decreix progressivament des de 64 LMH fins a 37,5 LMH, mentre que la pressió transmembrana augmenta lleugerament dels 2,13 barg fins als 2,33 barg. El volum final obtingut és de 20,3 mL; així el factor de concentració és 9,7 vegades.

Durant el segon experiment de l'estudi d'escalabilitat, es tracta un volum de 1.828 mL amb el sistema Quixstand. Per mantenir el grau d'escala de l'experiment 10 vegades superior, el

hollow fiber comercial amb característiques més similars a l'utilitzat en el primer experiment és de tipus Xampler (GE Healthcare) amb 110 cm^2 d'àrea i 100 kDa NMWC.

Es fixen les condicions inicials d'ultrafiltració d'acord amb la Figura 6.14a, en una pressió transmembrana de 25 barg, la qual proporciona 67 LMH. En aquest punt, s'observa el manteniment de l'escala en ambdós experiments: es necessita aproximadament 10 vegades més pressió per tractar 10 vegades més aliment en el mateix període de temps, ja que el flux de permeat inicial és pràcticament el mateix.

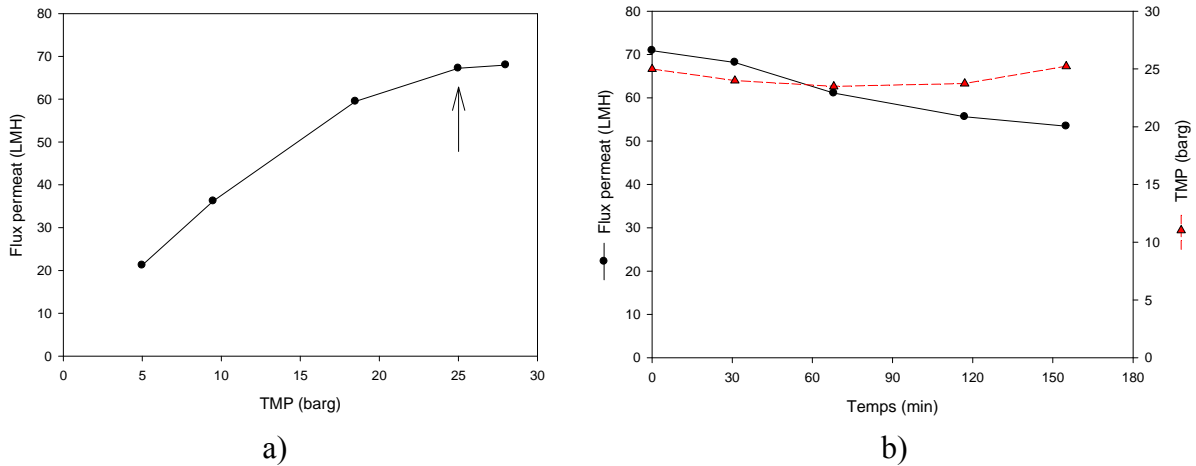


Figura 6.14. Caracterització del procés d'ultrafiltració a mitjana escala (Quixstand): a) Perfil de condicions operacionals, la sageta indica les condicions seleccionades; b) Perfils de flux de permeat (●) i de pressió transmembrana (▲) durant l'etapa.

A la Figura 6.14b, es mostra l'evolució de la ultrafiltració un cop fixades les condicions d'operació. Els perfils de flux de permeat i pressió transmembrana progressen de forma similar segons allò descrit a la Figura 6.13b, amb un temps d'operació global de 156 minuts. Finalment, el grau de concentració és de 9,5 vegades, amb un volum de final de 192 mL.

Atenent a que les dues etapes de purificació següents (tractament d'àcids nucleics i condicionament) es porten a terme en el mateix equip que la concentració, es decideix analitzar les dades de recuperació del vector adenoviral i d'eliminació dels contaminants conjuntament després de la superació de les tres etapes.

6.5.5. Tractament d'àcids nucleics

Durant l'etapa de lisi cel·lular s'alliberen importants quantitats d'àcids nucleics (DNA i RNA de conformacions i mides molt heterogènies) al brou de cultiu. L'origen d'aquestes impureses és majoritàriament cel·lular, encara que també pot provenir en menor mesura de DNA viral no encapsulat correctament durant el procés de maduració de les partícules. Tot i que, a pH fisiològic, la càpside posseeix una càrrega neta global negativa, existeixen zones amb càrrega positiva que poden interaccionar electrostàticament amb la càrrega fortament negativa dels àcids nucleics per agregar partícules víriques i augmentar la viscositat del brou de cultiu, tot complicant les posteriors etapes del procés de purificació [15]. D'altra banda, aquesta interacció pot donar lloc a virions que presentin a la superfície de la càpside quantitats

significatives de DNA, les quals, poden ser introduïdes a l'interior de la cèl·lula diana durant el procés d'infecció. Un cop a l'interior de la cèl·lula, els fragments de DNA, en especial els procedents del gen viral E1, poden provocar una resposta tumoral no desitjada [37].

Com a conseqüència, l'eliminació de la màxima quantitat possible d'àcids nucleics esdevé un objectiu clau en qualsevol procés de purificació de vectors adenovirals per a teràpia gènica. El grau d'eliminació, expressat com la concentració permesa de DNA residual en la dosi final, es fixa basant-se en una solució de compromís entre el risc que la seva presència comporta en el producte, i el benefici clínic que s'obté de la dosi [9]. Les recomanacions generals indiquen concentracions tan rigoroses com 100 pg/dosi [38], tot i que agències com la FDA poden acceptar concentracions més altes de fins a 10 ng/dosi, sempre i quan la mida dels fragments de DNA es trobi per sota de 100 ó 200 parells de bases [39].

Qualsevol de les etapes que conformen aquesta estratègia de purificació ja és efectiva en major o menor mesura en la supressió d'àcids nucleics. No obstant, per maximitzar aquesta supressió, en la majoria d'esquemes s'introdueix una etapa específica per al tractament dels àcids nucleics, la qual millora ostensiblement l'eliminació d'aquests en etapes posteriors.

Els principals mètodes de tractament, els quals han de ser força efectius donat l'important grau d'eliminació de DNA que s'ha d'assolir (entre 10^5 i 10^6 vegades respecte la quantitat inicial [12]), són dos. El primer d'ells és la precipitació selectiva de DNA emprant detergents catiónics. Les molècules de detergent s'uneixen als grups fosfat de la cadena de DNA, neutralitzant les càrregues i, posteriorment, els residus hidrofòbics del detergent interaccionen per precipitar-la. Tot i que el virió també està carregat negativament, en les condicions d'operació s'han aconseguit elevades eficiències de precipitació de DNA sense afectar significativament les partícules adenovirals [37]. El segon mètode es basa en la digestió de fragments d'àcids nucleics mitjançant enzims anomenats nucleases, les quals reconeixen específicament una o varies seqüències de nucleòtids i hidrolitzen els enllaços fosfodièster que les uneixen, reduint-ne la mida.

En el present treball s'opta per la digestió enzimàtica, donat el seu elevat grau d'utilització en la majoria d'esquemes de purificació (veure Taula 2.5 de la introducció). En concret, la benzonasa (Merck KGaA) és l'enzim seleccionat. Aquesta endonucleasa és una proteïna originària del bacteri *Serratia marcescens* [40, 41], formada per dues subunitats de 30 kDa cadascuna unides per dos ponts disulfur [42, 43]. Per tenir una conformació activa, requereix la presència de l'ió Mg^{2+} com a cofactor i és inhibida per solucions d'ions monovalents, d'anió fosfat (PO_4^{3-}) i de sulfat d'amoni ($(NH_4)_2SO_4$) en concentracions superiors a 50 mM, 20 mM i 25 mM, respectivament.

Les principals raons per a la seva elecció són l'elevada capacitat per degradar DNA i RNA, amb diferents formes (cadena doble o senzilla, amb forma lineal o circular) fins a oligonucleòtids aproximadament de 3 a 8 parells de bases. D'altra banda, manté l'activitat en un ampli rang de condicions fisicoquímiques (veure Taula 6.8) i, finalment, es comercialitza amb elevats graus de puresa (99% i 90%) complint la normativa GMP.

Paràmetre	Rang òptim (Activitat $\geq 90\%$)	Rang efectiu (Activitat $>15\%$)
T (°C)	37	0 – 42
[Mg ²⁺] (mM)	1 – 2	1 – 10
pH	8,0 – 9,2	6,0 – 10,0

Taula 6.8. Rangs d'activitat de la benzonasa, segons les condicions fisicoquímiques d'operació [44].

En relació a les condicions d'operació de la nucleasa en aquesta etapa de purificació, cal esmentar que respecte a la temperatura, l'enzim es manté dins del rang d'activitat efectiu, ja que aquesta pren el valor ambient, aproximadament de 20 °C; cal recordar que, com s'ha descrit a l'apartat 6.2, a aquesta temperatura els vectors adenovirals es mantenen estables durant períodes que es poden perllongar una setmana. La concentració de Mg²⁺ i el pH es fixen amb la composició de la solució tampó per activar l'enzim, la qual conté, 1 mM MgCl₂ i 0,1 M Tris Base (pH = 8).

El principal inconvenient per a la seva utilització radica en el seu elevat cost. Per això, en un intent de minimitzar la quantitat de benzonasa emprada, és fonamental tractar el menor volum possible (principal raó de la presència de l'etapa de concentració prèvia), i optimitzar experimentalment el temps i la concentració d'operació de l'enzim. Amb aquesta finalitat, es mostren les dades procedents d'un estudi previ a aquest treball (María Mercedes Segura 2008, dades no publicades), on s'avalua el grau de digestió dels àcids nucleics de mostres procedents de l'etapa de concentració de 1 mL cadascuna, mitjançant l'anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa (veure Figura 6.15).

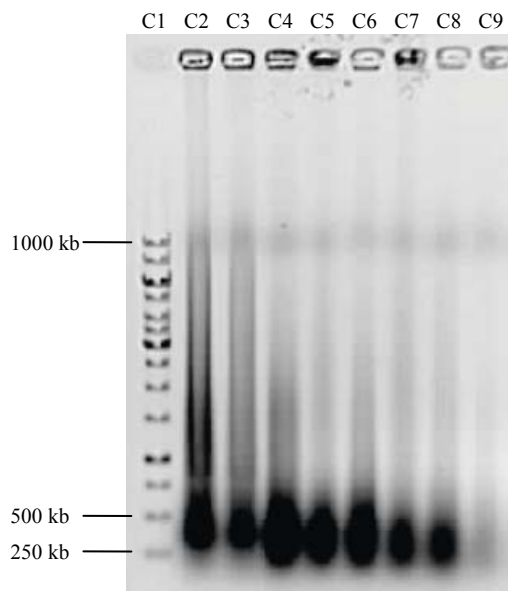


Figura 6.15. Anàlisi electroforètic amb gel d'agarosa de les condicions òptimes (concentració d'enzim i temps d'actuació) per a la digestió d'àcids nucleics. C1: Marcador de pes molecular. C2: Mostra concentrada inicial. C3: 0 UA/mL – 60 min. C4: 25 UA/mL – 30 min. C5: 25 UA/mL – 60 min. C6: 50 UA/mL – 30 min. C7: 50 UA/mL – 60 min. C8: 100 UA/mL – 30 min. C9: 100 UA/mL – 60 min. (María Mercedes Segura 2008, dades no publicades).

A mesura que, del carril C1 al C9, augmenta la concentració d'enzim i el seu temps de contacte amb la mostra, els fragments de DNA van disminuint de mida i la intensitat dels carrils va minvant. Clarament, al carril 9 és dona la mínima intensitat i les seves condicions (100 UA/mL durant 60 minuts) es consideren idònies per a la digestió dels àcids nucleics en fragments inferiors a 250 kb. D'acord amb la reducció d'intensitat en aquest carril, es produeix un 80% de degradació de DNA respecte la mostra concentrada inicial (carril C2).

Finalment, la determinació de totes les condicions d'operació permet el tractament de les fraccions procedents de la concentració. Per disposar de reproductibilitat en els resultats, es tracten les diferents fraccions de retíngut procedents de l'etapa realitzada a petita i mitjana escala durant un temps total de 75 minuts. Les mostres de permeat són igualment tractades només per poder comparar els valors, donat que en l'operació habitual no tindria sentit fer-ho.

A la Figura 6.16, es mostra el resultat de l'electroforesi en gel d'agarosa de les mostres anteriors i posteriors al tractament amb benzonasa. És important aclarir que a l'inici del procés amb un seguit de dilucions, s'ajusta la composició del tampó perquè compleixi amb el rang òptim de funcionament de l'enzim.

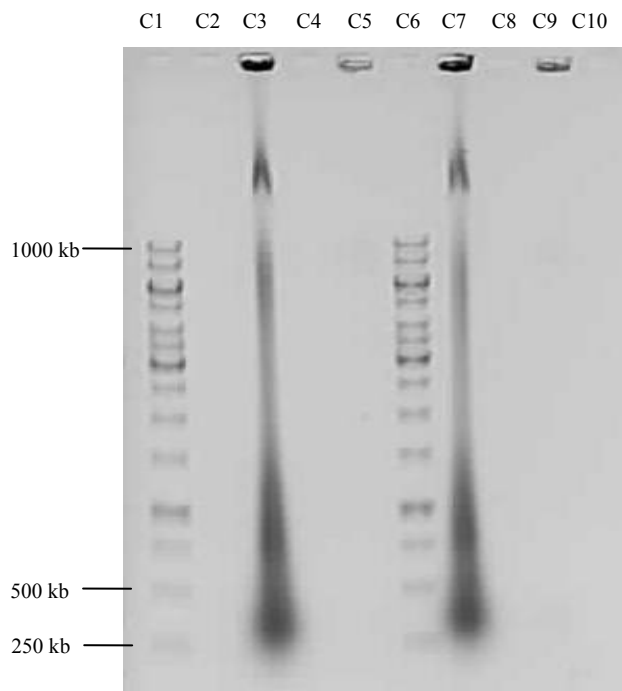


Figura 6.16. Anàlisi electroforètic amb gel d'agarosa del grau de digestió dels àcids nucleics durant l'etapa de purificació. C1: Marcador de pes molecular. C2: Permeat pretractament (Midjet). C3: Retíngut pretractament (Midjet). C4: Permeat posttractament (Midjet). C5: Retíngut posttractament (Midjet). C6: Marcador de pes molecular. C7: Retíngut pretractament (Quixstand). C8: Permeat pretractament (Quixstand). C9: Retíngut posttractament (Quixstand). C10: Permeat posttractament (Quixstand).

Del carril 2 al 5 es carreguen al gel les alíquotes procedents de la ultrafiltració realitzada a petita escala (Midjet). Les mostres homòlogues a mitjana escala (Quixstand) es troben del

carril 7 al 10.

Els carrils 3 i 4 contenen mostres del retingut a petita escala abans i després del tractament amb benzonasa respectivament; existeix una disminució d'intensitat del carril 4 que representa una degradació del DNA en fragments inferiors a 250 kb amb un valor del 83%. En el cas del Quixstand, aquesta degradació s'eleva al 87%. En canvi, les mostres dels carrils 2 i 4, així com 8 i 10, són carrils de permeat, on la presència d'àcids nucleics roman mínima, el reduït tall nominal de pes molecular emprat en la concentració de 100 kDa minimitza, doncs, la fuga de fragments de DNA al permeat.

Tot i que el pH no es mesura en cap moment durant aquesta etapa, els elevats percentatges de degradació de DNA (83% i 87%) corroboren que les condicions són òptimes com perquè l'enzim actuï en tot moment, almenys, en el rang efectiu d'activitat.

Cal recordar també que durant el present tractament no es dona cap mena de purificació, ja que només es degrada DNA que encara no s'ha eliminat del sistema, de manera que l'anàlisi de recuperació del vector adenoviral i la d'eliminació de contaminants es porta a terme després de l'etapa següent etapa, la de condicionament.

6.5.6. Condicionament

El condicionament és l'última etapa que conforma la secció de purificació inicial. Es tracta d'un pas preparatiu que té dos objectius principals: l'eliminació dels fragments generats durant el procés de tractament enzimàtic i l'adaptació de les mostres a les condicions de la secció de purificació intermèdia.

La diafiltració és l'operació unitària ideal per assolir aquests objectius, degut al fet que aprofita la ultrafiltració per eliminar els diminuts fragments de DNA i no requereix, doncs, de cap equip addicional. El tret distintiu respecte la ultrafiltració és que a mesura que el permeat abandona el sistema i el volum a tractar en el tanc d'aliment disminueix, s'addiciona solució tampó que modifica la composició del retingut i l'ajusta a les etapes posteriors del procés.

El paràmetre a determinar durant el condicionament és el nombre de renovacions del volum inicial necessari per eliminar la màxima quantitat de contaminants, en aquest cas DNA, i assegurar la modificació de les condicions. En aquest sentit, la concentració de solut restant en el retingut durant la diafiltració es pot expressar mitjançant l'Equació 6.3 [45]:

$$C_R = C_0 \cdot \exp(-R_V \cdot (1 - \sigma))$$

Equació 6.3. Expressió de la concentració de solut en el retingut durant la diafiltració (C_R), on: C_0 és la concentració de solut a l'aliment, R_V és el nombre de recanvis de volum, σ és el coeficient de rebuig.

Per a soluts permeables a la membrana, com és el cas dels fragments de DNA de mida reduïda, el coeficient de rebuig (σ) té un valor de zero. Sota aquestes condicions, la diafiltració amb tres volums de tampó redueix la concentració d'àcids nucleics fins a un 95%. Cal considerar que l'augment del nombre de recanvis actua en detriment de la infectivitat de les partícules, ja que s'incrementa l'estrès tallant que pateixen en circular per l'interior del

hollow fiber. Per tant, es decideix aplicar els tres cicles de diafiltració.

Les condicions de diafiltració són idèntiques a les emprades en l'etapa de concentració, i s'utilitza el mateix filtre. Durant cadascun dels cicles de diafiltració, el retingut és diluït a la meitat emprant la nova solució de tampó i el procés es perllonga fins que el volum de retingut retorna al valor inicial, a partir d'aquí es repeteix el protocol. Al final del procés de diafiltració a petita escala es disposa d'una alíquota de 20,5 mL; mentre que a mitjana escala es disposen de 196 mL.

En superar les etapes de concentració, tractament d'àcids nucleics i condicionament, es tracten les mostres finals sorgides. Els rendiments de recuperació del vector adenoviral per a les dues escales avaluades es poden observar a la Taula 6.9.

Petita escala (Midjet)				
Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Clarificat	198	2,84	5,63	100,00
Retingut	20,5	21,56	4,42	78,60
Permeat	240	0,00006	0,0002	0,004
Mitjana escala (Quixstand)				
Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Clarificat	1.828	7,95	145,32	100,00
Retingut	196	63,8	125,04	86,06
Permeat	2.650	0,00002	0,00005	0,00004

Taula 6.9. Resultat global de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de concentració, tractament d'àcids nucleics i condicionament.

Els resultats obtinguts demostren l'escalabilitat del sistema *hollow fiber*, ja que els percentatges de recuperació vírica obtinguts en la fracció de retingut són molt similars en ambdós sistemes, proporcionant un valor mitjà d'un $82,3 \pm 8,3\%$ ($n = 2$). De la mateixa manera, el permeat acumulat després de les tres operacions mostra una presència de producte ínfima degut al tall de pes molecular emprat de 100 kDa, el qual disminueix la pèrdua de partícules víriques. A la vista dels rendiments globals presents a la taula, es pot concloure que tant la concentració com el tractament d'àcids nucleics presenten rendiments de recuperació molt elevats, tot i que aquests no hagin estat analitzats independentment.

A la Taula 6.10 i la Taula 6.11, es mostren les concentracions proteiques i de DNA de les fraccions analitzades.

Petita escala (Midjet)				
Mostra	Volum (mL)	Concentració (µg/mL)	Total (mg)	Eliminació (%)
Clarificat	198	1.692	335,1	0,00
Retingut	20,5	10.364	212,5	36,60
Permeat	240	483	115,9	65,41
Mitjana escala (Quixstand)				
Mostra	Volum (mL)	Concentració (µg/mL)	Total (mg)	Eliminació (%)
Clarificat	1.828	1.620	2.961,4	0,00
Retingut	196	9.919	1.944,1	34,34
Permeat	2.650	430	1.139,5	61,52

Taula 6.10. Resultat global de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de concentració, tractament d'àcids nucleics i condicionament.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (ng/mL)	Total (µg)	Eliminació (%)
Clarificat	198	16.449	3.256,93	0,00
Retingut	20,5	10.501	215,27	93,39

Taula 6.11. Resultat global de l'anàlisi de DNA després del procés de concentració, tractament d'àcids nucleics i condicionament (valors de petita escala).

Els resultats tornen a ésser força reproduïbles. El percentatge mitjà d'eliminació de proteïnes al concentrat és del $35,5 \pm 3,0\%$ ($n = 2$), superior al valor obtingut a la clarificació ($8,94 \pm 5\%$), ja que la membrana d'ultrafiltració disposa d'unes dimensions de porus que li permeten ésser permeable a certa fracció de proteïnes, mentre que la membrana de microfiltració no té les mateixes característiques, i deixa circular a través seu la pràctica totalitat de les mateixes.

En canvi, el rendiment d'eliminació d'àcids nucleics sí que millora ostensiblement, afectat pel tàndem d'operacions unitàries, amb un valor del $93,39 \pm 2\%$. Aquest fet demostra que el tractament amb benzonasa ha digerit els fragments de DNA en mides molt reduïdes, amb la capacitat de travessar els porus de la membrana del *hollow fiber* durant la diafiltració.

6.5.7. Captura

La secció de purificació inicial avaluada fins ara agrupa una sèrie d'etapes basades, sobretot, en la separació sòlid-líquid amb objectius molt variats. Així, la lisi cel·lular allibera els vectors adenovirals (i els contaminants) de l'interior de les cèl·lules; posteriorment, es clarifica el sobrenedant per eliminar les restes sòlides; gràcies a la concentració, es redueix el volum a purificar; es tracta enzimàticament el material per digerir les restes d'àcids nucleics presents i aquestes s'eliminen amb el condicionament del fluid gràcies a l'etapa de diafiltració.

És en aquest punt, quan s'inicia la secció de purificació intermèdia, on es fa necessari l'aplicació d'una operació bàsica centrada específicament en el producte, que el diferenciï i el

capturi de la resta de contaminants amb la major selectivitat possible. Com s'ha comentat a l'apartat 6.5, la cromatografia d'intercanvi iònic és l'operació unitària seleccionada per portar a terme aquest objectiu.

La purificació per cromatografia d'intercanvi iònic es basa en la separació dels components d'acord amb la seva càrrega superficial neta i el grau d'interacció electrostàtica reversible que es dona entre aquesta càrrega i la de signe oposat que presenta la reïna. En un biofàrmac la càrrega prové de les proteïnes que componen la seva superfície; en funció del pH al qual es troba, cada proteïna i, com a conseqüència, cada biofàrmac disposa d'una càrrega neta global característica. La cromatografia de bescanvi iònic aprofita aquest fet, i modifica les condicions de la fase mòbil per afavorir la unió o l'elució dels components a purificar, segons convingui.

La reïna és l'element clau del bescanvi iònic, ja que conforma la fase estacionària. Es troba composta per nombroses partícules esfèriques, la matriu de les quals no té càrrega, és inert i, habitualment, porosa. En la totalitat de la seva superfície es troben units covalentment els anomenats grups funcionals o lligands, veritables protagonistes de l'intercanvi. Aquests ja disposen de càrrega, la qual queda inicialment neutralitzada per la presència de contraions de signe contrari que són reversiblement bescanviats per altres del mateix signe sense alterar la càrrega dels grups funcionals. Les matrius amb lligands carregats positivament disposen de contraions negatius (anions), de manera que s'anomenen bescanviadors aniònics; en canvi, els bescanviadors catiónics disposen de contraions positius (cations) per ésser bescanviats, essent negativa la càrrega dels lligands units a la matriu (veure Figura 6.17).

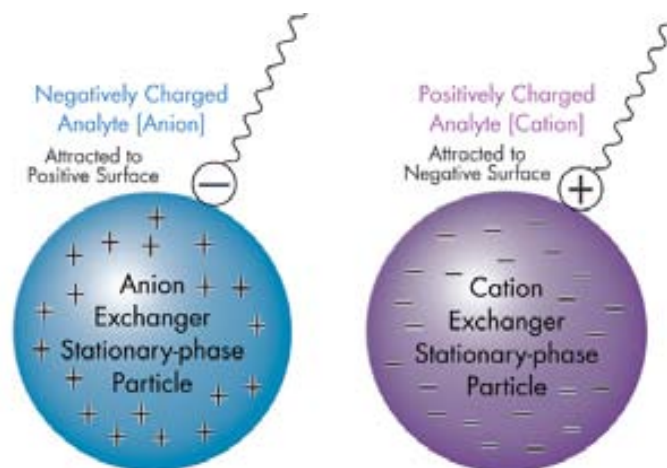


Figura 6.17. Bescanviadors iònics: a la esquerra, bescanviador aniònic; a la dreta, bescanviador catiónic [46].

Els principals grups funcionals que integren les reïnes de bescanvi iònic es poden observar a la Taula 6.12. Aquests es poden classificar en dos tipus, forts o febles, la qual cosa no té res a veure amb la força de l'enllaç entre el grup funcional i el contraió, sinó que es relaciona amb la facilitat del grup funcional per ésser neutralitzat davant d'una base o d'un àcid.

	Grup funcional	Fórmula	Tipus
Bescanviadors aniónics	Amoni quaternari (Q)	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fort
	Dietilaminoetil (DEAE)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Feble
	Dietilaminopropil (ANX)	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Feble
Bescanviadors catiónics	Sulfopropil (SP)	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	Fort
	Metil sulfonat (S)	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{SO}_3^-$	Fort
	Carboximetil (CM)	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Feble

Taula 6.12. Principals grups funcionals en reïnes de bescanvi iònic.

La tècnica cromatogràfica de bescanvi iònic es divideix en una sèrie d'etapes que es descriuen a continuació i es mostren esquemàticament a la Figura 6.18 [47]:

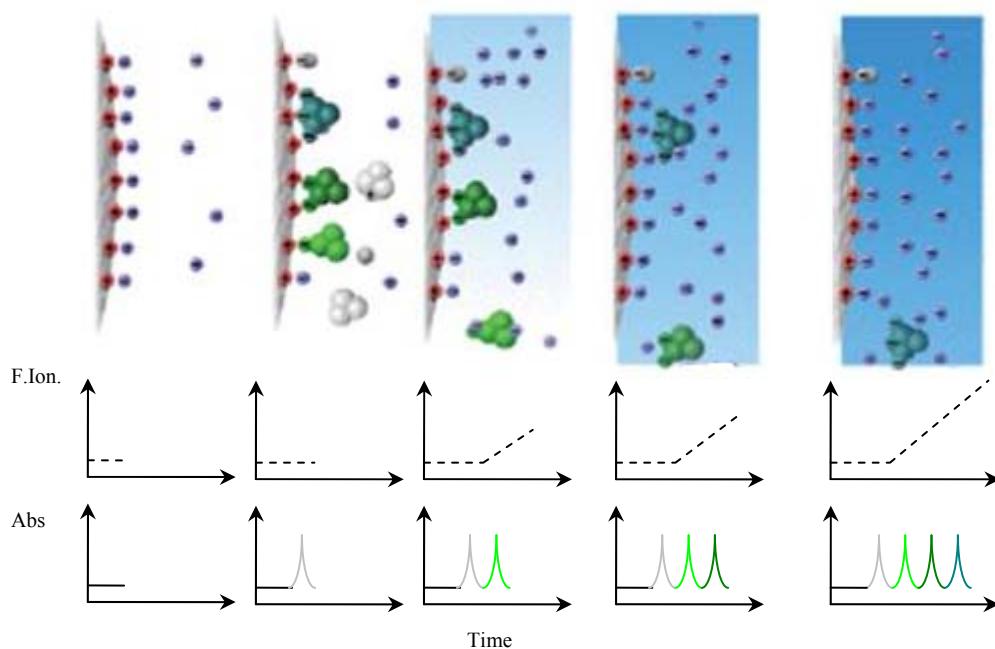


Figura 6.18. Principi de la cromatografia d'intercanvi aniónic: els components queden purificats en funció de la càrrega neta de les proteïnes. Així, primer se separa el component de color blanc (càrrega neta zero o positiva) i a mesura que augmenta el gradient de força iònica, es va separant el component de color verd flux, el component verd fort i, per últim, el component blau (càrrega neta més alta) [47].

- Equilibrat: inicialment, s'equilibra la fase estacionària a l'interior de la columna fent circular el tampó inicial.
- Càrrega: s'introdueix la mostra a la columna en les mateixes condicions que la fase d'equilibrat, normalment per dilució, perquè interactui amb la reïna.
- Rentat: a partir d'aquest moment, es fa circular a través de la columna tampó inicial per eliminar aquells components amb una càrrega del mateix signe que els contraions de la reïna o amb una càrrega neta zero. Per consegüent, el volum eluït del sistema durant aquesta etapa conté espècies que no interaccionen amb els contraions, i només circulen a través de la columna (*flowthrough*).

- **Elució:** durant l'etapa d'elució s'utilitza un segon tampó, anomenat tampó d'elució, per alterar progressivament les condicions de la fase mòbil i separar gradualment aquells components que han quedat adsorbits a la fase estacionària.

Per aconseguir-ho, existeixen dos possibles patrons: l'elució en gradient o l'elució en esglaó. L'elució en gradient permet la separació dels components amb una millor resolució; s'utilitza habitualment en etapes de desenvolupament quan es desconeix la composició inicial d'una mostra. En canvi, l'elució en esglaó s'utilitza quan la separació s'aplica a escala industrial, ja que és més fàcil de controlar i estalvia en el consum de solucions tampó.

Fonamentalment, els patrons d'elució es poden generar modificant dues propietats de la fase mòbil: el pH o la força iònica (concentració de sal). La major part de les biomolècules s'elueixen variant la segona propietat, donat que l'estabilitat funcional d'aquestes es troba dins d'un rang de pH molt estret. A mesura que la força iònica va augmentant, els ions de la sal (típicament Na^+ o Cl^-) van competint per les càrregues dels grups funcionals amb els components adsorbits a la reïna i, paulatinament, els van substituint. Com a conseqüència, es dona un ordre d'elució: les proteïnes amb menor càrrega superficial neta són les que elueixen en primer lloc, mentre que aquelles amb una càrrega major abandonaran la columna més tard, en necessitar una força iònica superior per desadsorbir-se.

- **Rentat:** en finalitzar la fase d'elució, es realitza una nova fase de rentat per eliminar els contaminants que hagin pogut quedar adsorbits sobre la reïna.
- **Equilibrat:** finalment, es regenera la reïna amb el tampó inicial per ésser reaprofitada per a posteriors usos.

No té cap sentit mesurar la durada de cadascuna de les etapes en temps o volum absolut, ja que cada columna té un volum diferent i un flux òptim d'operació que es determina empíricament i depèn del tipus de reïna. De manera que les etapes es mesuren en unitats de volums de columna (CV).

En el cas de la purificació dels vectors adenovirals, la càrrega neta prové de les proteïnes que constitueixen l'exterior de la càpside viral. Tal i com s'ha comentat amb anterioritat a l'apartat 6.2, la proteïna II, base del capsòmers-hexon, és la majoritària a la càpside i proporciona al virió una càrrega neta per sobre de -17.000, acompanyada d'un punt isoelèctric (pI) aproximadament de 6, a pH fisiològic de 7 unitats. És, doncs, el bescanvi aniònic, la tècnica de separació escollida per resoldre la fase de captura.

6.5.7.1. Desenvolupament de la tècnica

Per aplicar exitosament la cromatografia de bescanvi aniònic en la separació dels virions cal definir quins són els elements que configuren aquesta tècnica (equip, solucions tampó, reïna, etc...) i el mètode de purificació que proporciona el millor rendiment de separació.

Des d'un punt de vista operacional, els experiments de cromatografia es realitzen a baixa pressió gràcies a la utilització del cromatògraf FPLC ÄKTAexplorer (GE Healthcare), descrit

a l'apartat 9.6.4.1 del capítol de materials i mètodes. Aquest sistema, sobre el qual s'acobla la columna de bescanvi aniònic, disposa dels components hidràulics necessaris, en concret una bomba de pistó amb 4 capçals, per generar qualsevol tipus de patró d'elució amb gran precisió a partir de les solucions tampó. D'altra banda, també incorpora els sensors per detectar les variables fonamentals per al monitoratge del procés de purificació (pH, conductivitat i absorbància de l'espectre visible i ultraviolat), així com la possibilitat de recollir les diferents alíquotes que s'obtenen després de l'elució dels components a través de la columna (veure Figura 6.19 i Figura 6.20).

Un cop injectada la mostra al sistema, s'activa el sistema de control i monitoratge UNICORN (GE Healthcare), el qual executa el protocol d'elució prèviament desenvolupat, adquireix les dades del procés de purificació i possibilita el seu processament posterior, si és necessari.

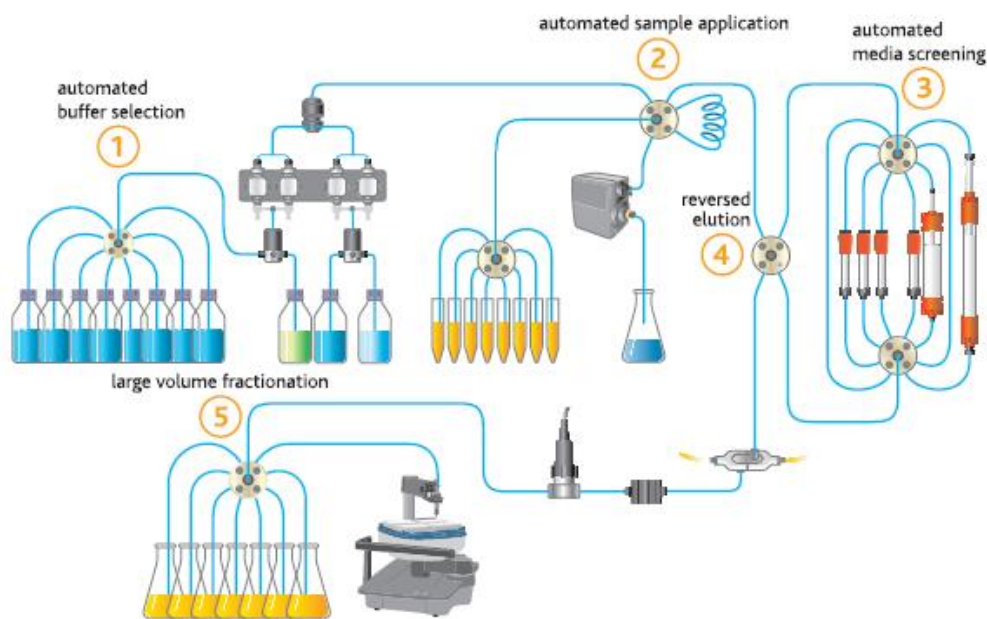
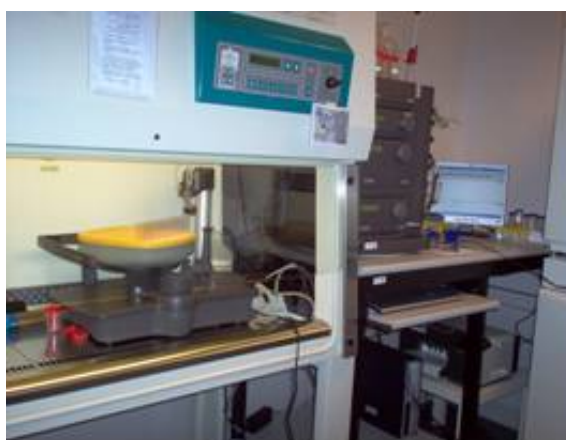


Figura 6.19. Esquema dels elements que integren el sistema de cromatografia líquida de baixa pressió (FPLC) ÄKTAexplorer [44].



a)



b)

Figura 6.20. Sistema de cromatografia líquida a baixa pressió (FPLC) ÄKTAexplorer (GE Healthcare) emprat en els experiments.

Tenint en compte l'esmentat punt isoelèctric de l'adenovirus i per evitar la seva pèrdua d'infectivitat a pH inferior a 6, el desenvolupament de l'etapa de captura es produirà sempre a pH tamponat lleugerament bàsic (pH = 8), així també s'assegura la càrrega neta negativa de la partícula en tot moment. La variació de força iònica serà, doncs, l'alternativa per eluir els components adsorbits a la columna de bescanvi aniònic [39]. D'acord amb aquest fet, s'utilitzaren dues solucions tampó: el tampó inicial amb una concentració 20 mM Tris-HCl (pH = 8), 2 mM MgCl₂, 10 mM NaCl i 2,5% (p/v) glicerol, i el tampó d'elució amb una composició idèntica a l'anterior, però al que s'afegeix una concentració 1.000 mM NaCl.

Malgrat que, com s'ha comentat a l'apartat anterior, existeixen diversos tipus de grups funcionals, les reïnes cromatogràfiques presenten diferències de comportament no només basades en aquests, sinó també en l'estructura fisicoquímica de la seva matriu. D'aquesta manera, existeixen dos tipus principals de reïnes emprades per realitzar el bescanvi aniònic: els bescanviadors convencionals i els anomenats bescanviadors tentaculars (veure Figura 6.21).

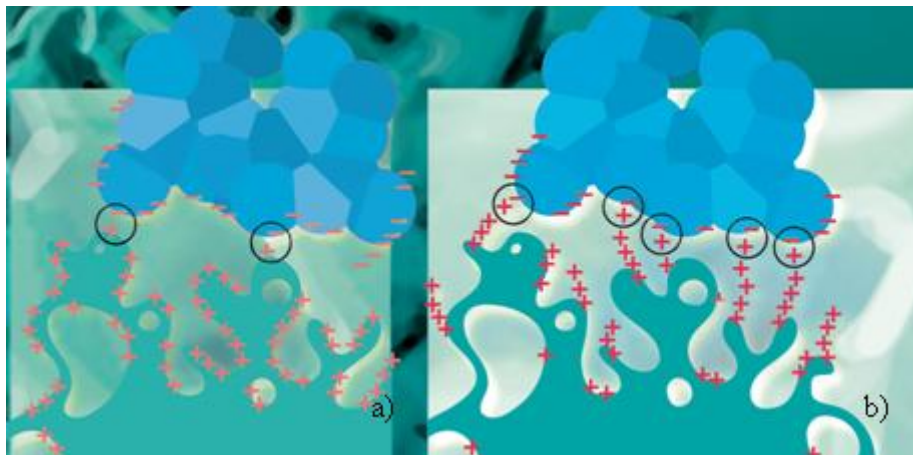


Figura 6.21. Tipus de reïnes d'acord amb la matriu de bescanvi aniònic: a) bescanviador aniònic convencional; b) bescanviador aniònic tentacular. Els cercles negres indiquen els lligands accessibles a les biomolècules sense impediments estèrics [48].

Els primers, tradicionalment més emprats, es basen en matrius hidrofíliques compostes majoritàriament per polisacàrids com la cel·lulosa, l'agarosa o el dextrans. En la majoria d'aquests medis, els lligands es troben adherits directament a la superfície de la matriu; com a conseqüència, la capacitat de la matriu es pot veure compromesa, ja que la seva complexa estructura pot provocar que molts dels grups funcionals no es trobin físicament disponibles per a biomolècules de mida considerable i, per tant, no es doni el contacte necessari per a la seva adsorció. Per solucionar aquest inconvenient, a finals dels anys 80, es van començar a desenvolupar els bescanviadors tentaculars.

Els bescanviadors tentaculars consisteixen en matrius polimèriques sintètiques altament estables fabricades amb metacrilat o poliacrilamida, les quals han estat tractades perquè els grups funcionals es trobin covalentment ancorats a aquestes, gràcies a cadenes polimèriques, lineals i flexibles anomenades col·loquialment tentacles. Els tentacles permeten a les

biomolècules una major accessibilitat als grups funcionals degut al menor impediment estèric, especialment en el cas de macromolècules de gran mida com són els anticossos o els vectors adenovirals [48]. Per tant, la capacitat del medi pot millorar sensiblement respecte la dels bescanviadors convencionals.

En els apartats següents de desenvolupament de la tècnica, s'avalua el comportament dels dos tipus de bescanviadors aniònics en l'etapa de captura.

6.5.7.1.1. Reïna convencional

La reïna convencional seleccionada per realitzar l'intercanvi aniònic és la reïna Capto Q (GE Healthcare). Aquesta consisteix en una matriu composta per agarosa, la qual cosa la fa ser inert i altament estable, a la que s'enllacen covalentment grups funcionals d'amoni quaternari (Q) (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.6.4.2 del capítol de materials i mètodes). Per tant, es tracta d'un bescanviador aniònic de tipus fort dissenyat per a la purificació intermèdia de biomolècules.

La reïna es troba preinstal·lada en una columna HiTrap (GE Healthcare), la qual disposa d'un llit fix amb un volum de 1 mL de medi. Considerant les característiques de la reïna i de la columna, el fabricant aconsella no superar un flux màxim de 1 mL/min. En el present treball, per evitar problemes de sobrepressió i afavorir la baixa difusivitat del virió, es fixa el cabal en 0,5 mL/min, el qual equival a una velocitat lineal de 78 cm/h, d'acord amb les dimensions de la columna.

També es decideix seguir els consells del fabricant de la reïna i de la columna per definir el mètode de purificació. Considerant que la columna es troba equilibrada inicialment (sinó cal fer-ho com a mínim durant 5 CV), es carrega la mostra en 0,5 mL totals amb una dilució 1/15 en tampó inicial per ajustar les seves condicions a les d'equilibrat i assegurar l'adsorció del producte a la reïna. Posteriorment, es renta la columna durant 10 CV amb tampó inicial. L'elució es realitza durant 15 CV, seguint un patró d'elució en gradient, augmentant la concentració de NaCl des de 0 mM fins a 1.000 mM. La reïna es renta durant 5 CV amb 1.000 mM NaCl i, finalment, es reequilibra amb la solució tampó inicial fins que la línia base del cromatograma torni als valors originals.

El primer anàlisi és el de la mostra de referència d'adenovirus pur, amb l'objectiu de proporcionar els valors d'elució característics que posteriorment es compararan amb les mostres a purificar. L'aplicació de la mostra a la columna es reproduïx al cromatograma de la Figura 6.22. En aquest es representen al llarg del temps, d'una banda, les absorbàncies dins de l'espectre ultraviolat a 260 i 280 nm, variables que proporcionen el seguiment en línia de les espècies a separar i, d'altra banda, l'evolució de la conductivitat (mS/cm), juntament amb la concentració teòrica de sal (mM), indicativa del mètode d'elució aplicat.

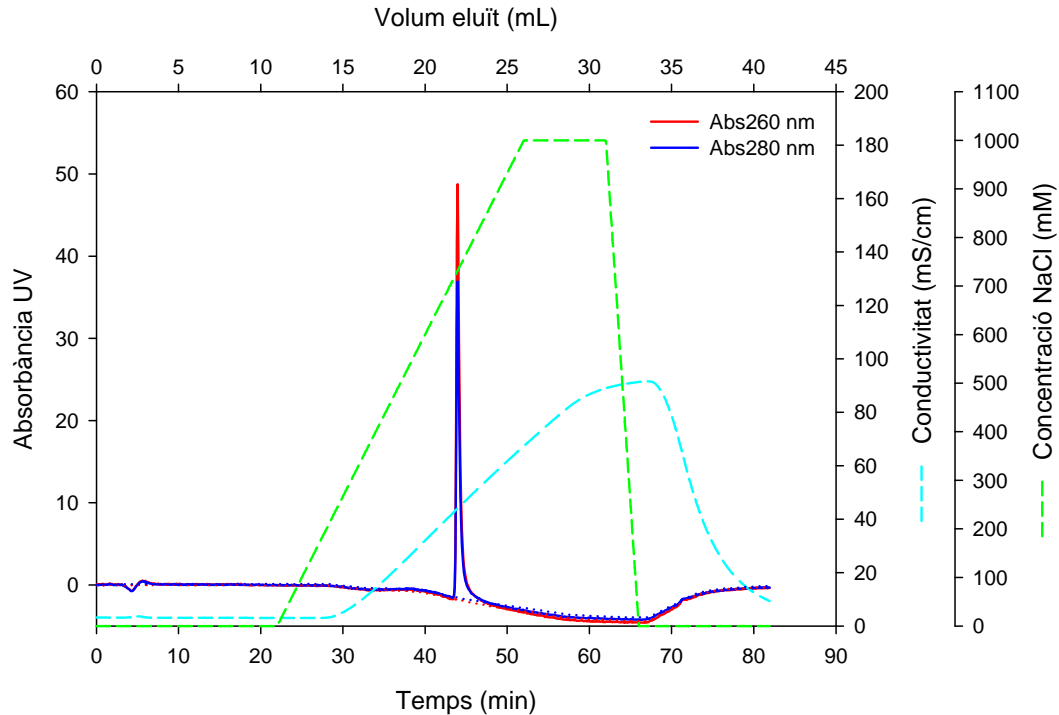


Figura 6.22. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (---) i concentració de sal (mM) (---) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reïna Capto Q) sobre una mostra d'adenovirus pur. Superposició del blanc (línies de punts). L'elució segueix un perfil de gradient lineal de 0 – 1.000 mM NaCl. S'observa el pic del vector adenoviral.

Com es pot observar, durant l'aplicació del mètode de purificació existeix un retard d'aproximadament 5 CV entre la concentració i la conductivitat, donat que el sensor que la mesura se situa al final del sistema i incorpora el temps de retard que triga la mostra a circular a través del circuit hidràulic del cromatògraf.

En resulta l'aparició d'un únic pic molt ben definit a una conductivitat de 44 mS/cm, el qual representa un temps de retenció de 43,9 minuts. Les longituds d'ona seleccionades per fer el seguiment del mètode de purificació, 260 nm i 280 nm, coincideixen amb els pics màxims d'absorbància d'àcids nucleics (DNA) i proteïnes, respectivament. Gràcies a que el virió madur es troba format per proteïnes i DNA en una relació única, en comparació amb els contaminants principals com les proteïnes o els àcids nucleics lliures, ambdós d'origen cel·lular i/o viral; el quocient dels valors d'absorbància en el pic (A_{260}/A_{280}) proporciona la identificació qualitativa de les partícules adenovirals. Així, una mostra de DNA pur té uns valors entre 1,8 i 2, mentre que les proteïnes pures proporcionen valors entre 0,4 i 0,6. Per tant, el vector adenoviral pur disposarà de valors entre aquests extrems, concretament entre 1,2 i 1,3 [28]. En el cas concret, el resultat és de 1,31, la qual cosa pot indicar un elevat grau de puresa de la mostra de referència.

Un cop conegudes les característiques d'elució del vector adenoviral pur, la següent mostra a tractar és la mostra de material procedent de les etapes prèvies del procés de purificació per avaluar-ne el comportament. Per aquesta raó, s'injecten a la columna 0,5 mL de volum total (dilució 1/5 en tampó inicial) i s'aplica el mateix mètode de purificació. El resultat obtingut es

mostra a la Figura 6.23.

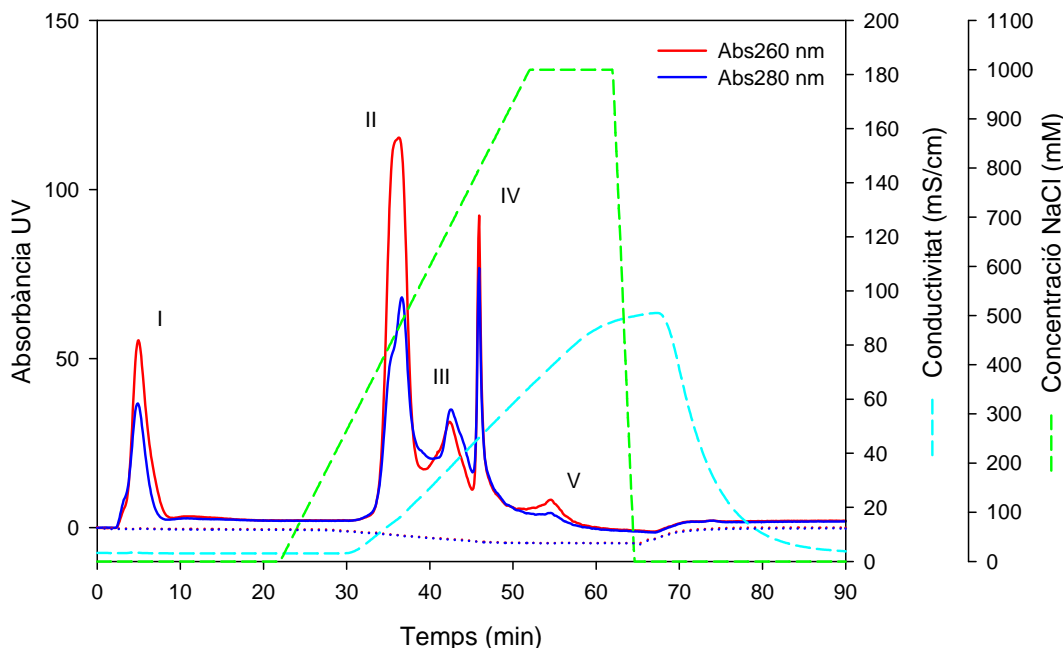


Figura 6.23. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reïna Capto Q) sobre una mostra d'adenovirus sense purificar. Superposició del blanc (línies de punts). L'elució segueix un perfil en gradient lineal de 0 – 1.000 mM NaCl. El pic IV correspon al vector adenoviral, la resta de pics es discuteixen al text.

El cromatograma obtingut és més complex que el previ, amb la presència de fins a 5 pics distingibles. Es pot fer una descripció qualitativa de la composició d'aquests pics a partir de la relació d'absorbància (A_{260}/A_{280}), donat que per conèixer la composició exacte del mateix serien necessàries anàlisis addicionals com l'electroforesi.

Així doncs, d'acord amb aquesta relació, el pic I amb un temps de retenció de 5,1 minuts i una relació d'absorbància de 1,62 seria una mescla complexa de contaminants on predominaria el DNA de baix pes molecular [34], tot i que amb una conformació tal que la càrrega neta total de la mescla és zero; per tant, no interacciona amb la reïna i elueix de la columna en la fracció de *flowthrough*. Durant l'etapa d'elució, apareixen quatre pics amb baix grau de resolució, és a dir, superposats en menor o major mesura i la seva separació no arriba a la línia base. El pic II presenta un temps de retenció de 36,2 minuts i una relació d'absorbància de 1,84, de manera que la quantitat de DNA present seria superior a l'anterior pic; això fa que la seva càrrega neta sigui negativa, encara que més feble que la resta de pics que el segueixen. El pic III amb un temps de retenció de 42,3 minuts tindria una composició predominantment de proteïnes, ja que la seva relació d'absorbància és de 0,91. El virus elueix en el pic IV amb un temps de retenció pràcticament idèntic al de la mostra de referència (45,9 minuts), en canvi la seva relació d'absorbància ha disminuït (1,20) per la presència d'impureses. Finalment, el pic V amb un temps de retenció de 54,5 minuts i una relació d'absorbància de 1,90 conté la fracció on fonamentalment predominarien fragments de DNA.

Aquests presenten la densitat de càrrega superficial més negativa de tota la mostra i, com a conseqüència, elueixen més tard, a una concentració de sal més elevada [1]. Queda palès, doncs, l'important nombre de contaminants encara presents en la mostra injectada, malgrat que aquesta ja ha superat diverses etapes de l'estratègia.

Per tant, fóra bo modificar el mètode d'elució en un intent de reduir el nombre de pics, agrupant al màxim els contaminants, a ser possible en la fracció de *flowthrough* perquè no interaccionin amb la reïna i, a la vegada, per augmentar el grau de resolució del pic d'adenovirus. Amb aquest objectiu, es plantegen una sèrie de canvis en la metodologia emprada.

Inicialment, la columna s'equilibra a una concentració de clorur de sodi propera al valor que provoca l'elució del virus (350 mM). Posteriorment, s'injecta la mostra amb un volum total de 0,5 mL (dilució 1/5 en tampó inicial), i es renta la columna durant 10 CV. L'elució es realitza seguint un patró d'elució en gradient al llarg de 10 CV, incrementant la concentració de sal des de 350 mM fins al 1.000 mM. A continuació, la reïna es renta durant 5 CV amb a una concentració 1.000 mM NaCl i, finalment, es reequilibra fins que la línia base del cromatograma torna als valors originals. El resultat quan es tracta la mostra problema amb aquestes noves condicions, es mostra a la Figura 6.24.

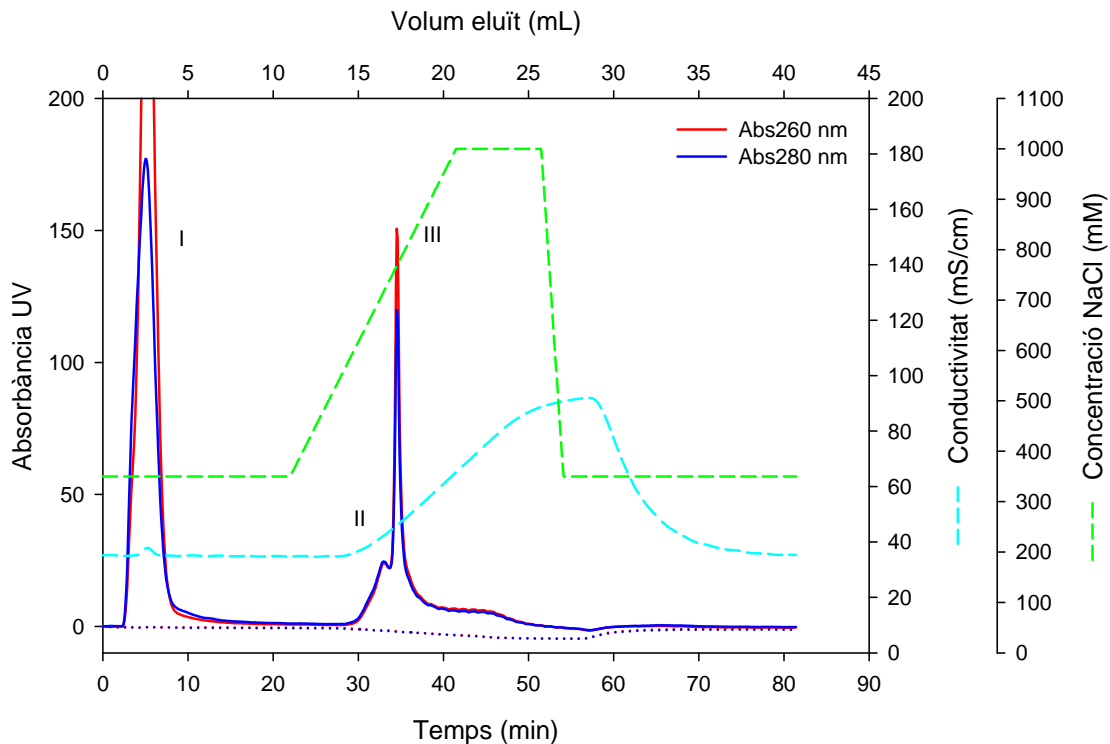


Figura 6.24. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi anònic (reïna Capto Q) sobre una mostra d'adenovirus sense purificar. Superposició del blanc (línies de punts). L'elució segueix un perfil gradient lineal de 350 – 1.000 mM NaCl. El pic III correspon al vector adenoviral.

Tal i com es pot observar a la figura anterior, el nombre de pics del cromatograma queda reduït a tres. El pic I augmenta ostensiblement la seva àrea i el seu màxim d'absorbància, ja que els contaminants que a la Figura 6.23 elueixen a concentracions inferiors o pròximes a 350 mM s'han agrupat en aquest pic que no interacciona amb la reïna en les condicions d'equilibrat, i abandona la columna en la fracció de *flowthrough*. A continuació apareix el pic II, pràcticament solapat al pic següent, ric possiblement en contaminants proteics. En el pic III, es troba el vector adenoviral que, degut a les noves condicions del mètode, es caracteritza per tenir un nou temps de retenció de 34,5 minuts, inferior al mesurat fins al moment (45,9 minuts), ja que ara el perfil d'elució assoleix abans el valor de conductivitat de 44 mS/cm.

El grau de resolució dels pics II i III podria haver estat superior si la concentració de sal durant l'etapa d'equilibrat hagués estat més pròxima al valor d'elució de l'adenovirus. Això comportaria el risc de perdre adenovirus en les fraccions anteriors; per tant, es decideix no modificar el mètode d'elució. L'única variable que cal determinar és la quantitat de vector adenoviral que la reïna serà capaç d'adsorbir minimitzant les possibles pèrdues; aquest paràmetre es determina experimentalment a partir de l'assaig de capacitat dinàmica.

La capacitat o càrrega d'una reïna de bescanvi aniònic és una mesura quantitativa de la seva habilitat per adsorbir la biomolècula d'interès. Existeixen dos tipus: la capacitat estàtica (o disponible) i la dinàmica. La primera indica la quantitat total de biomolècula que pot ésser captada per unitat de volum de reïna, sota condicions experimentals; si una d'aquestes condicions és el flux que circula a través de la reïna, la capacitat estàtica passa a denominar-se capacitat dinàmica [47].

La capacitat dinàmica és una propietat intrínseca de la reïna, depèn de les propietats físiques de la biomolècula a separar, així com de les condicions experimentals, principalment del flux, a les quals es realitza l'assaig. En aquest sentit, la pràctica totalitat de medis comercials emprats en la cromatografia de bescanvi aniònic (entre ells la reïna Capto Q), originalment dissenyats per a la purificació de proteïnes, presenten valors de càrregues dinàmiques al voltant de 100 mg d'albúmina (BSA)/mL de reïna [49, 50]. En el cas de la purificació de vectors adenovirals, tot i que les dades són limitades, les reïnes es tornen molt menys eficients i les càrregues dinàmiques publicades es troben al voltant de $0,5 \cdot 10^{12}$ i $5 \cdot 10^{12}$ partícules víriques físiques (PV)/mL de reïna, aquest rang correspon entre 0,14 i 1,4 mg de virus/mL de reïna [9, 28, 29, 34, 37]. Tot i això, els valors anteriors només proporcionen una indicació i no haurien d'utilitzar-se per desenvolupar el procés. La capacitat dinàmica ha d'ésser determinada empíricament per a les condicions operacionals desenvolupades fins al moment en el present treball, utilitzant les alíquotes tractades, anteriors a l'etapa de captura.

La determinació de la capacitat dinàmica es basa en l'anàlisi de les fraccions recol·lectades (1 mL) que elueixen de la columna fins a la saturació d'aquesta. Essencialment, el mètode de purificació és el desenvolupat fins al moment, però el material injectat ha de ser suficient com per saturar la reïna. Amb aquest objectiu se sobrecarrega la columna amb 10 mL de volum

total (dilució 1/2 en tampó inicial). Aquest fet obliga a perllongar l'etapa de càrrega de la columna durant 10 CV per assegurar la introducció total de la mostra, i la resta del mètode roman igual. El resultat es presenta a la Figura 6.25.

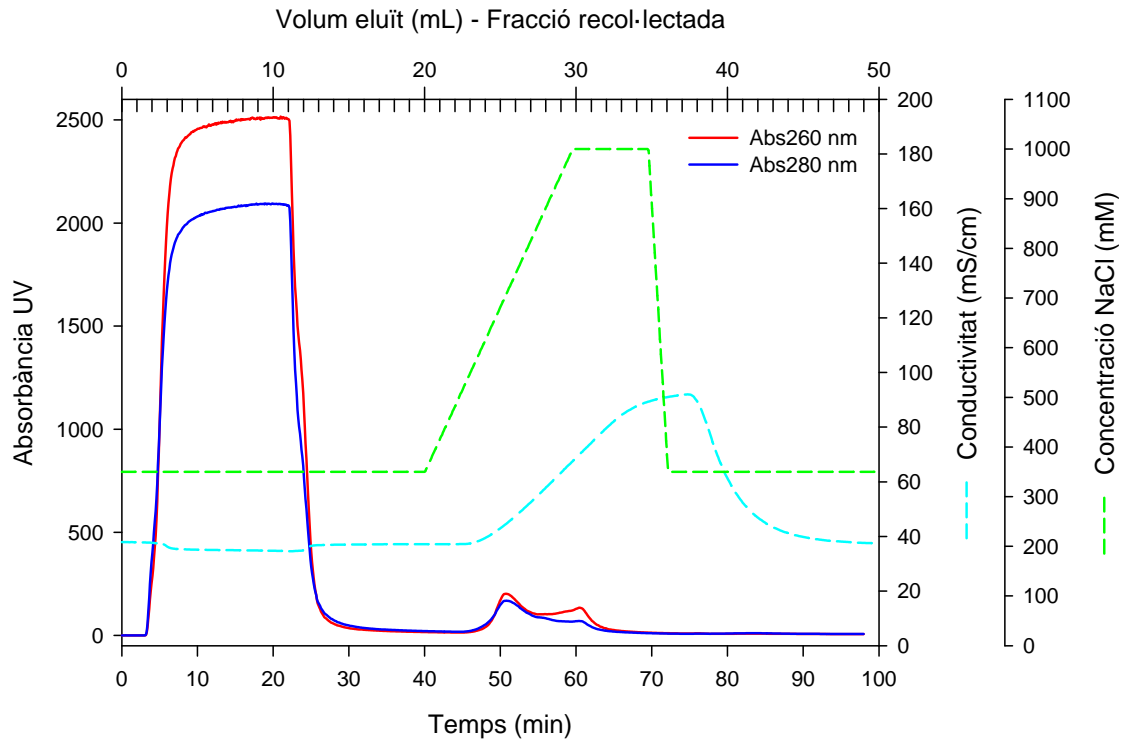


Figura 6.25. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniònic per determinar la capacitat dinàmica de la reïna Capto Q. L'elució segueix un perfil en gradient lineal de 350 – 1.000 mM NaCl.

El tret més característic de l'anterior cromatograma és la important quantitat de material eluït en la fracció del *flowthrough*, degut a la quantitat de mostra injectada tan important. És en aquest període quan el vector adenoviral es bescanvia progressivament amb els contraions de la reïna i es genera un front a l'interior de la columna, el qual es desplaça fins que la totalitat del medi que integra la columna es troba saturat. A partir d'aquell instant, els vectors carregats abandonen el sistema emmascarats amb la resta de contaminants. A partir dels 22 minuts, es produeix una forta caiguda d'absorbància, com a conseqüència que la totalitat de la mostra no adsorbida ha circulat per la columna. Per tant, com a màxim s'hauran d'analitzar les 12 primeres alíquotes de 1 mL per determinar la capacitat. Després de 20 CV, la reïna es troba neta per començar l'elució del material adsorbit, a la que segueix el posterior rentat i reequilibrat.

S'analitza el títol víric de les fraccions recol·lectades i es calcula la seva relació respecte el títol víric de l'aliment per obtenir la càrrega relativa. Aquesta última es representa vers el volum acumulat de les fraccions per proporcionar l'anomenada corba de capacitat o de ruptura (veure Figura 6.26).

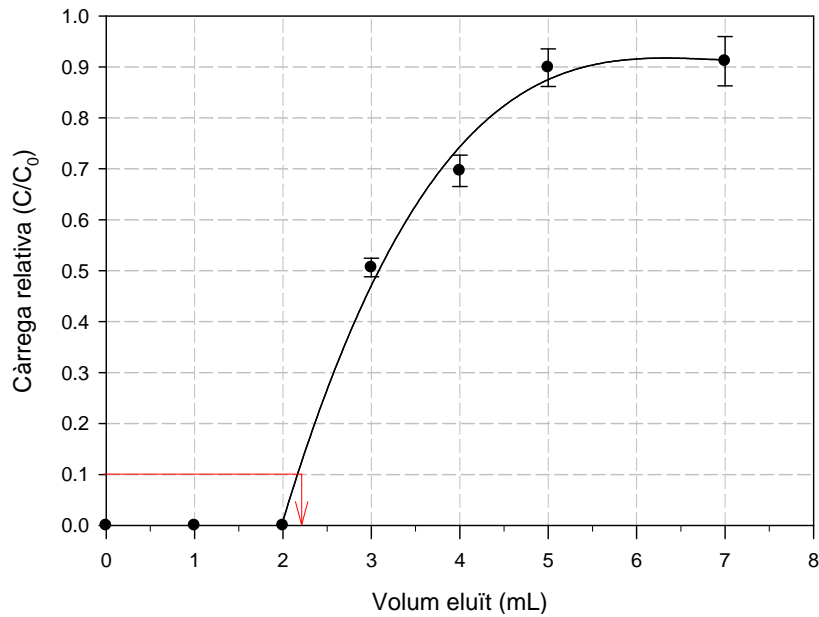


Figura 6.26. Corba de capacitat dinàmica de la reïna Capto Q. La sageta vermella indica el volum de ruptura (2,2 mL).

La corba mostra com fins als 2 mL, el llit capta tota la càrrega vírica introduïda. A partir d'aquest volum, comença una zona de transferència de matèria regida per l'equilibri de les partícules víriques distribuïdes entre la fase sòlida i la fase líquida: la impossibilitat progressiva per part de la reïna d'adsorbir més virus fa que la càrrega relativa augmenti fins a estabilitzar-se al 90% als 5 mL, considerant-se que la columna es troba totalment saturada, atès a la variabilitat en els valors de títol.

La capacitat dinàmica no s'obté exactament en el punt on la columna es troba saturada (càrrega relativa igual a 0), sinó que, habitualment, es proporciona un marge fins a l'anomenat punt de ruptura. Aquest es fixa entre un 5% i un 10% de la càrrega relativa, és a dir, el límit de càrrega de la columna es fixa per perdre, com a màxim, un 10% de virus a l'efluent. Per al medi de bescanvi aniònic Capto Q i les condicions operacionals utilitzades, el volum de ruptura és de 2,2 mL. Tenint en compte el flux emprat de 0,5 mL/min, aquest valor també es pot expressar com a temps de ruptura de 4,4 minuts, és a dir, després d'aquest període d'operació s'hauria d'aturar el sistema i regenerar el contingut de la columna o recanviar-lo, ja que a l'efluent es començaria a perdre més d'un 10% de la concentració present a l'aliment.

Existeix un aspecte que pot influir en l'obtenció final del volum de ruptura. Aquest se centra en el fet que la mostra injectada per fer l'assaig de capacitat, abans d'ésser recol·lectada, ha de circular per l'interior de tot el circuit hidràulic del cromatògraf, així com de la columna. Com a conseqüència, es genera un volum mort de 1,6 mL que forma part dels 2 mL que triga en aparèixer el *flowthrough* a la Figura 6.26. Si el volum del llit on es realitza el test de capacitat dinàmica és elevat, o bé, la concentració del producte a l'aliment és baixa, aquest volum es pot menysprear. No és el cas en les condicions del present treball, ja que el volum de la columna (1 mL) és, fins i tot, inferior al volum mort i la càrrega inicial de $2,8 \cdot 10^{11}$

UI/mL és bastant important.

Considerant aquest últim factor, el volum de ruptura corregit és de 0,6 mL (diluït 1/2). Per tant, la capacitat Capto Q sota les condicions experimentals desenvolupades fins al moment és de $8,4 \cdot 10^{10}$ UI/mL de reïna. Per comparar aquest valor amb els publicats a la bibliografia, s'assumeix que la relació acceptada de partícules víriques físiques respecte d'infectives és de 10/1 [51], i que una partícula d'adenovirus serotipus 5 té un pes molecular de $167 \cdot 10^6$ Da [6], això proporciona una capacitat de $8,4 \cdot 10^{11}$ PV/mL de reïna o 0,23 mg de virus/mL de reïna. Aquest valor se situa a la zona baixa del rang bibliogràfic abans esmentat (0,14 – 1,4 mg de virus/mL de reïna).

La forma de la corba de ruptura és indicativa de l'eficiència del procés de transferència de matèria que s'està portant a terme en els porus de la reïna; com més abrupta sigui la corba, és a dir, com més sobtat sigui el canvi de volum per passar d'una càrrega relativa 0 fins a 1, menys limitació patirà aquest procés i més pròxim es trobarà el punt de ruptura al punt de saturació total de la reïna. A nivell del bescanvi a l'interior del llit, això equival a disposar d'un front d'adsorció més perpendicular a les parets de la columna, i a aprofitar més sòlid abans d'arribar al punt de ruptura (veure Figura 6.27).

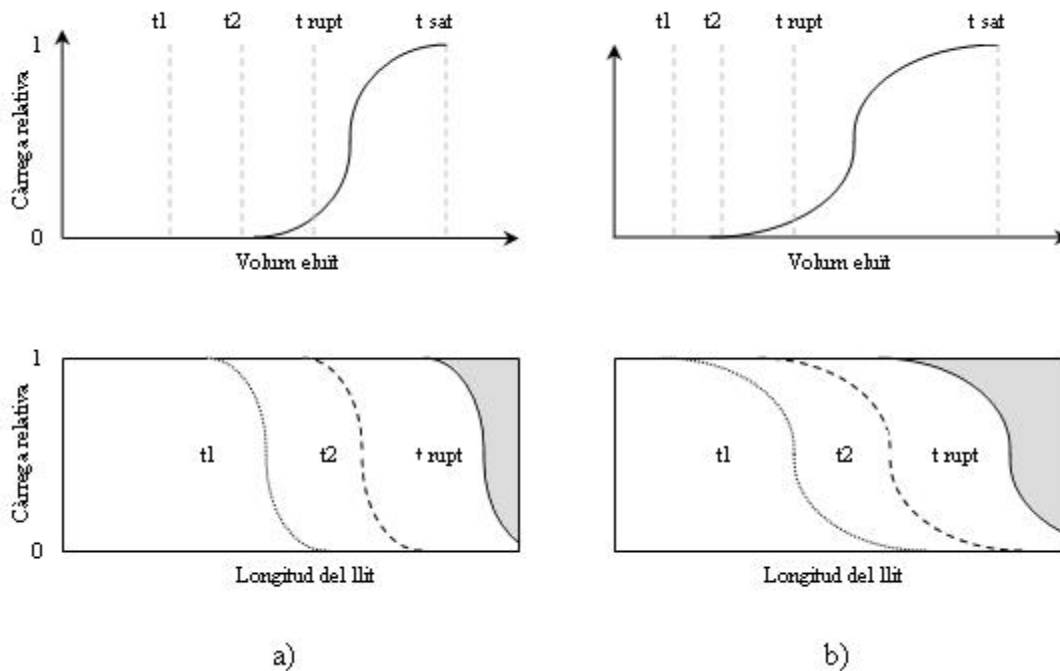


Figura 6.27. Efecte de la forma de la corba de ruptura. La reïna (a) presenta un perfil més abrupte que la (b), de manera que el volum de reïna sense ser utilitzat en el punt de ruptura, indicat de color gris, serà menor [52].

Un altre paràmetre important que proporciona la corba de capacitat i que té relació directa amb la seva forma és el rendiment de llit utilitzat (η). Aquest es defineix com la quantitat de matèria adsorbida en el punt de ruptura respecte la quantitat màxima de matèria adsorbida per la reïna i s'expressa segons l'Equació 6.4:

$$\eta = \frac{W_{rupt}}{W_{sat}}$$

Equació 6.4. Definició del rendiment de llit utilitzat (η), on: W_{rupt} és la càrrega de ruptura, W_{sat} és la càrrega de saturació.

A la seva vegada, la càrrega de ruptura és, per definició, la massa de solut adsorbit fins al temps de ruptura respecte la massa de reïna reberta al llit. Realitzant un balanç de matèria a la columna, porta a l'equació següent:

$$W_{rupt} = \frac{M_{S,entrada}(t_{rupt}) - M_{S,sortida}(t_{rupt})}{M_{reïna}}$$

Equació 6.5. Expressió de la càrrega de ruptura (W_{rupt}), on: $M_{S,entrada}(t_{rupt})$ és la massa de solut injectada a la columna de l'inici fins al temps de ruptura, $M_{S,sortida}(t_{rupt})$ és la massa de solut eluïda de la columna de l'inici fins al temps de ruptura, $M_{reïna}$ és la massa de reïna.

Tenint en compte el flux que circula a través de la columna, l'equació anterior és pot desenvolupar per obtenir l'Equació 6.6:

$$W_{rupt} = \frac{C_0 \cdot Q_V \cdot t_{rupt} - Q_V \cdot \int_0^{t_{rupt}} C(t) dt}{M_{reïna}} = \frac{C_0 \cdot V_{rupt} - \int_0^{V_{rupt}} C(V) dV}{M_{reïna}}$$

Equació 6.6. Expressió de la càrrega de ruptura (W_{rupt}), on: C_0 és la concentració de solut inicial, Q_V és el flux volumètric que circula a través de la columna, t_{rupt} és el temps de ruptura, C és la concentració, $M_{reïna}$ és la massa de reïna, V_{rupt} és el volum de ruptura.

En funció de la corba de capacitat, l'equació anterior es pot reorganitzar com:

$$W_{rupt} = \frac{V_{rupt} - \int_0^{V_{rupt}} \left(\frac{C}{C_0} \right) dV}{M_{reïna} / C_0}$$

Equació 6.7. Expressió de la càrrega de ruptura (W_{rupt}), on: C_0 és la concentració de solut inicial, C és la concentració, $M_{reïna}$ és la massa de reïna, V_{rupt} és el volum de ruptura.

De manera anàloga, per a les condicions de saturació, es té:

$$W_{sat} = \frac{V_{sat} - \int_0^{V_{sat}} \left(\frac{C}{C_0} \right) dV}{M_{reïna} / C_0}$$

Equació 6.8. Expressió de la càrrega de saturació (W_{sat}), on: V_{sat} és el volum de saturació, C_0 és la concentració de solut inicial, C és la concentració, $M_{reïna}$ és la massa de reïna.

Per tant, si utilitzem l'Equació 6.7 i l'Equació 6.8, l'Equació 6.4 resulta:

$$\eta = \frac{W_{rupt}}{W_{sat}} = \frac{V_{rupt} - \int_0^{V_{rupt}} \left(\frac{C}{C_0} \right) dV}{V_{sat} - \int_0^{V_{sat}} \left(\frac{C}{C_0} \right) dV}$$

Equació 6.9. Expressió final del rendiment d'utilització del llit (η), on: W_{rupt} és la càrrega de ruptura, W_{sat} és la càrrega de saturació, V_{rupt} és el volum de ruptura, V_{sat} és el volum de saturació, C_0 és la concentració de solut inicial, C és la concentració.

Per tant, el rendiment de llit utilitzat es determina a partir de la resolució de la integral de la corba de capacitat, és a dir, calculant l'àrea sota la corba de capacitat fins al volum de ruptura o fins al de saturació.

Per al cas estudiat, η té un valor de 31%, el qual indica un baix aprofitament de la reïna Capto Q per adsorbir vectors adenovirals sota les condicions del mètode de purificació dissenyat, probablement degut a que el fenomen d'adsorció es dona majoritàriament a la superfície de les perles que componen la reïna i resten molts lligands sense interactuar en els porus de la matriu.

6.5.7.1.2. Reïna tentacular

La reïna tentacular seleccionada per realitzar l'intercanvi aniònic és la reïna Fractogel DEAE EMD (M) (Merck KGaA). La seva matriu es troba composta per partícules d'una mida entre 40 μm i 90 μm de metacrilat altament reticulat amb una mida de porus aproximada de 800 Å (veure la resta d'especificacions dins de l'apartat 9.6.4.2 del capítol de materials i mètodes). Aquest material proporciona una alta estabilitat mecànica i a la pressió, la qual permet la possibilitat d'operar a alts fluxos, en columnes de grans dimensions. Els tentacles es troben covalentment enllaçats a grups hidroxil de la superfície de la matriu. Degut a la seva inalterabilitat, aquest medi pot ésser emprat durant un nombre elevat de cicles d'utilització, posterior rentat i regeneració sense disminució aparent de la seva capacitat [50]. Els lligands que recobreixen els tentacles són de dietilaminoetil (DEAE), per tant, es tracta d'un bescanviador de tipus feble. Com es recull a la Taula 6.4, aquest medi es troba àmpliament reportat en la separació de vectors adenovirals per a teràpia gènica.

La utilització de la nova reïna tentacular podria afectar el desenvolupament de la tècnica efectuat fins al moment, en la mesura que podria modificar les condicions fixades fins al moment per ser contràries a les recomanacions del fabricant de la nova reïna. Per tant, perquè els resultats ja aconseguits siguin comparables en tot moment amb els nous, es decideix aplicar les mateixes condicions operacionals que per a la reïna Capto Q, sempre i quan siguin coherents amb les recomanacions del fabricant.

La reïna es troba reblerta en una columna de desenvolupament Tricorn 5/50 (GE Healthcare), la qual disposa d'un llit fix amb un volum de 1 mL. Considerant les característiques de la reïna i la columna, el fabricant aconsella operar a un flux lineal màxim que pot arribar als 800 cm/h i una pressió màxima de 2 MPa. En el present treball, d'acord amb el criteri expressat

anteriorment, també es fixa el flux en 0,5 mL/min, el qual en funció de les dimensions de la columna equival a una velocitat lineal de 153 cm/h, superior al cas de la reïna Capto Q (78 cm/h).

Com en el cas de la reïna convencional, la primera mostra que s'analitza és la mostra d'adenovirus pur com a referència. El mètode d'elució emprat és idèntic al cas de la reïna Capto Q. De manera que, es carrega la mostra en 0,5 mL de volum total (dilució 1/15) i el resultat de l'aplicació es reproduïx al cromatograma de la Figura 6.28.

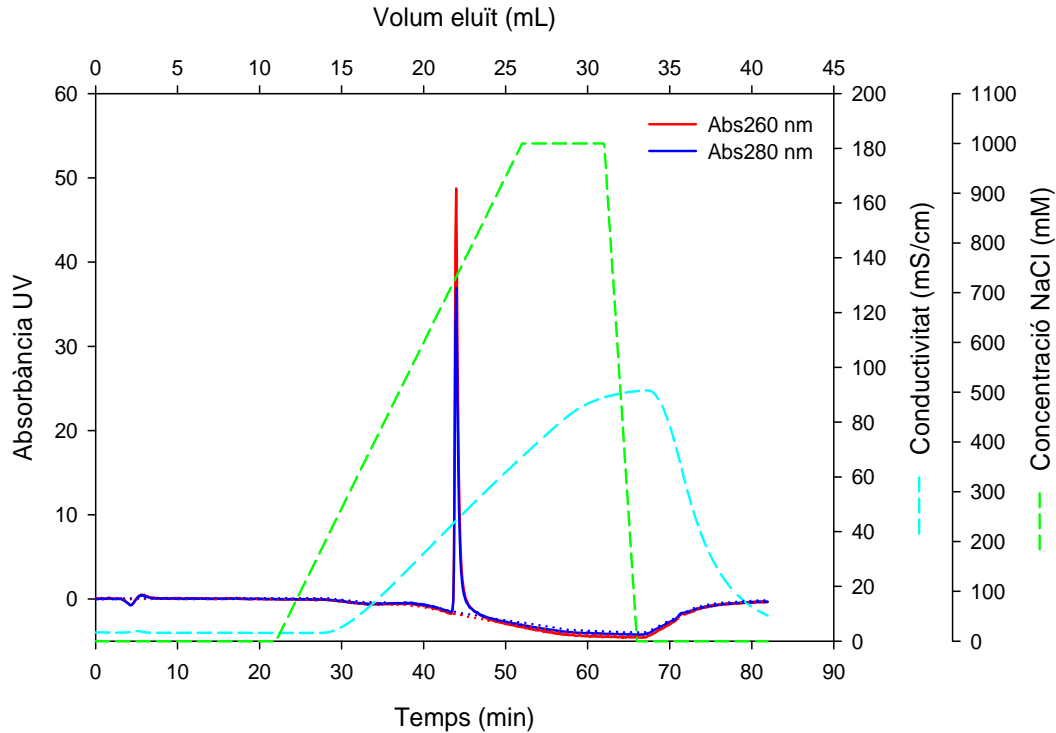


Figura 6.28. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reïna Fractogel DEAE) sobre una mostra d'adenovirus pur. Superposició del blanc (línies de punts). L'elució segueix un perfil de gradient lineal de 0 – 1.000 mM NaCl. S'observa el pic del vector adenoviral.

Com a la Figura 6.22, en resulta l'aparició d'un únic pic molt ben definit als 43,9 minuts i que correspon a una conductivitat de 44 mS/cm. La relació d'absorbància (A_{260}/A_{280}) és, en el cas concret de la reïna Fractogel DEAE, de 1,33.

En aquest cas, el cromatograma obtingut permet concloure que les condicions d'elució depenen exclusivament de la biomolècula a purificar i no del medi emprat. Per tant, es pot sotmetre directament la mostra de material procedent de les etapes prèvies del procés de purificació al mètode d'elució emprat en la Figura 6.24 per optimitzar la separació.

Així, s'injecten a la columna 0,5 mL de volum total (dilució 1/5 en tampó inicial) a la columna prèviament equilibrada a 350 mM; després es renta la columna durant 10 CV. L'elució també es realitza durant 10 CV, seguint un patró d'elució en gradient, incrementant la concentració de sal des de 350 mM fins al 1.000 mM. A continuació, la reïna es renta durant 5 CV amb a una concentració 1.000 mM NaCl i, finalment, es reequilibra fins que la

línia base del cromatograma torna als valors originals. El resultat es mostra a la Figura 6.29.

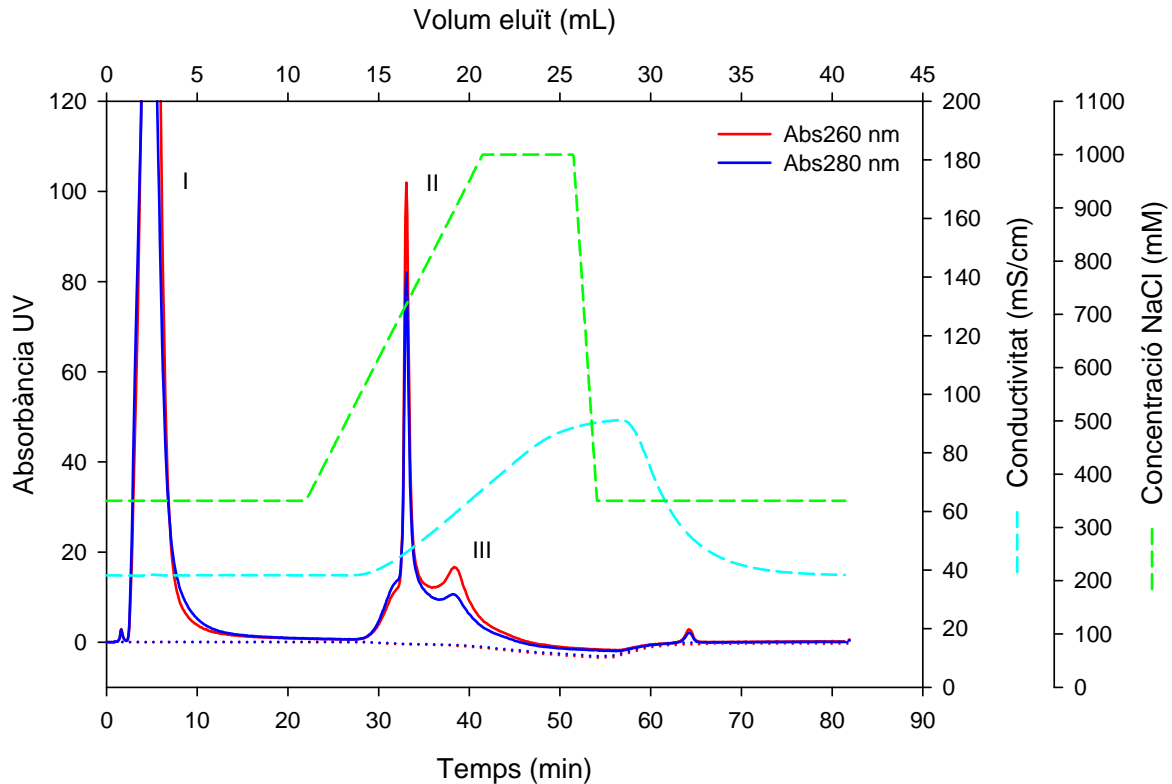


Figura 6.29. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reïna Fractogel DEAE) sobre una mostra d'adenovirus sense purificar. L'elució segueix un perfil en gradient lineal de 350 – 1.000 mM NaCl. El pic II correspon al vector adenoviral.

El cromatograma anterior té un aspecte molt similar al de la Figura 6.24. No obstant, el producte elueix predominantment en el pic II amb un temps de retenció de 33 minuts i una conductivitat de 44 mS/cm. Al pic I del *flowthrough*, que conté majoritàriament contaminants no adsorbts a la columna, se li uneix el pic III, ric en àcids nucleics que presenta una relació d'absorbància de 1,57.

Com en el cas de la reïna Cpto Q, l'única variable que resta per caracteritzar del medi Fractogel DEAE EMD (M) és la seva capacitat dinàmica per adsorbir els vectors adenovirals, tot minimitzant les possibles pèrdues.

Arrel de l'estructura del medi, descrita anteriorment a l'apartat 6.5.7.1, s'espera que la seva capacitat sigui més alta, per tant, se sobrecarrega la columna amb 20 mL de volum total i una dilució 1/2. Aquest fet obliga a perllongar l'etapa de càrrega de la columna durant 20 CV per assegurar la introducció total de la mostra; la resta del mètode roman igual i les fraccions recol·lectades continuen sent de 1 mL. El resultat de l'experiment es presenta al cromatograma de la Figura 6.30.

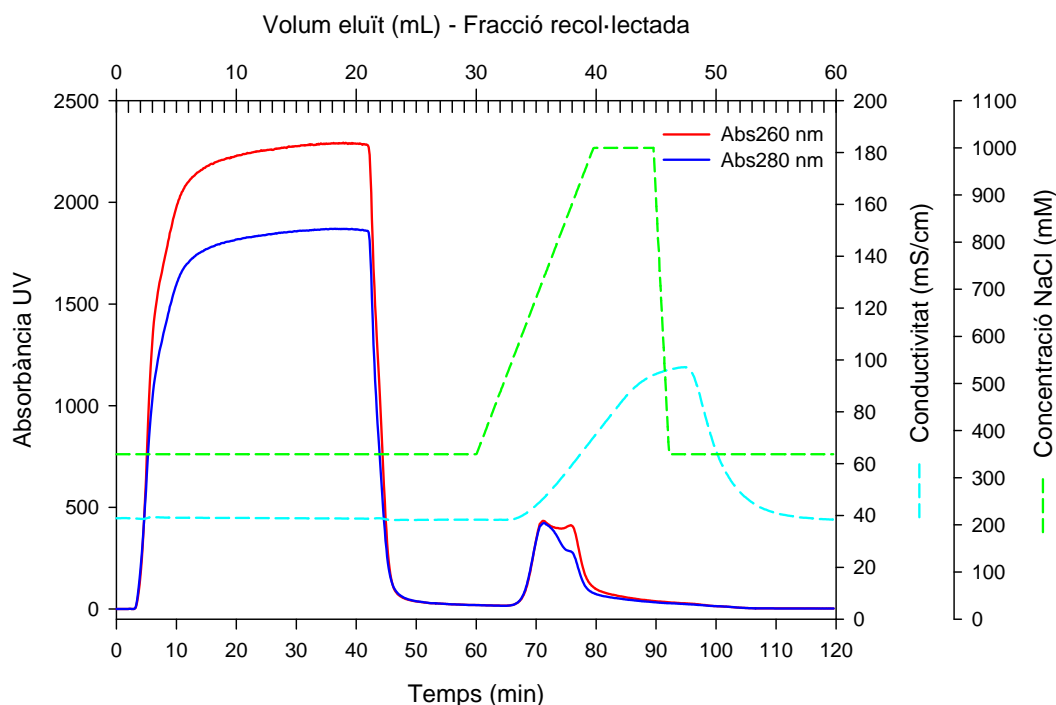


Figura 6.30. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic per determinar la capacitat dinàmica de la reïna Fractogel DEAE. L'elució segueix un perfil en gradient lineal de 350 – 1.000 mM NaCl.

Com a la Figura 6.25, la quantitat de material eluït en la fracció del *flowthrough* és molt important, degut a la quantitat de mostra inicial injectada. A partir dels 42 minuts, es produeix la caiguda d'absorbància, com a conseqüència del seu abandonament de la columna.

De la gran quantitat de fraccions recol·lectades, només s'analitzen les sis primeres per determinar el seu títol víric. Es calcula la càrrega relativa de cadascuna, i es representa la corba de ruptura a la Figura 6.31.

És en aquesta representació on s'observen diferències sensibles del comportament de la reïna tentacular respecte el de la reïna convencional. A diferència de la corba de ruptura del medi Capto Q (veure Figura 6.26), la Figura 6.31 presenta la forma de sigmoide típica de les corbes de capacitat amb una zona de transferència de matèria, abans d'arribar a la càrrega de saturació, molt més abrupta que l'anteriorment observada. Com a conseqüència, el procés de transferència de matèria presenta menys limitacions, i el volum de ruptura de 3,2 mL es troba més pròxim al volum de saturació de 5 mL que en el cas de reïna convencional.

Considerant el volum mort del sistema (1,6 mL), el volum de ruptura corregit és de 1,6 mL, amb un factor de dilució 1/2, aproximadament tres vegades superior al cas de la reïna convencional. La càrrega inicial de l'assaig és de $2,4 \cdot 10^{11}$ UI/mL, de manera que, la càrrega de ruptura en partícules infectives correspon a $3,8 \cdot 10^{11}$ UI/mL de reïna i, assumint una relació 10 PV/1 UI i un pes molecular del virió de $167 \cdot 10^6$ Da, la càrrega esdevé $3,8 \cdot 10^{12}$ PV/mL de reïna o 1,06 mg de virus/mL de reïna. Aquest valor ja se situa en la zona alta del rang de valors bibliogràfics abans esmentat (0,14 – 1,4 mg de virus/mL de reïna).

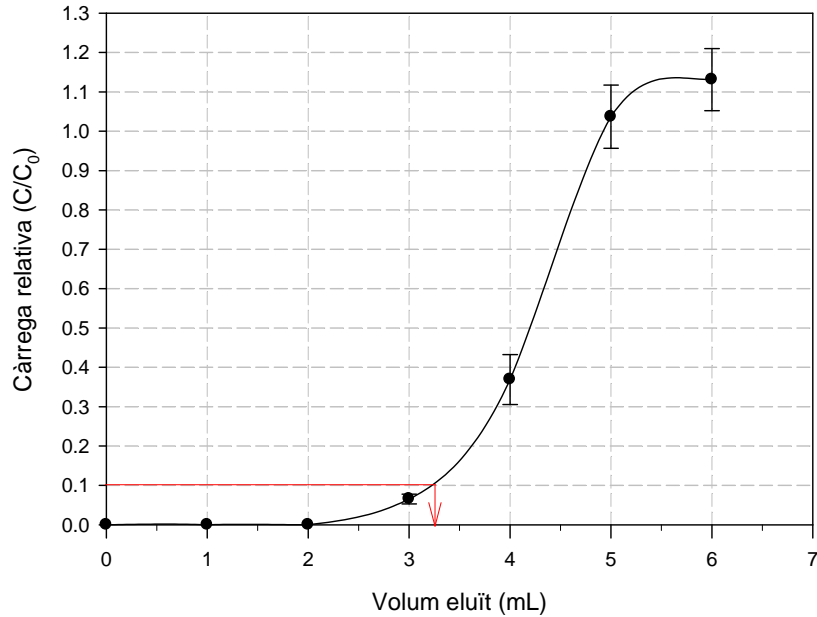


Figura 6.31. Corba de capacitat dinàmica de la reïna Fractogel DEAE EMD (M). La sageta vermella indica el volum de ruptura (3,2 mL).

L'últim paràmetre que posa de manifest, encara més, la superioritat en el comportament de la reïna tentacular és el rendiment de llit utilitzat. Aquest presenta un valor del 61%, el qual indica un bon aprofitament de la reïna Fractogel DEAE per adsorbir vectors adenovirals sota les condicions del mètode de purificació dissenyat.

A la Taula 6.13 es resumeixen els principals paràmetres que caracteritzen les dues reïnes avaluades en el present treball.

Reïna	Volum de ruptura (mL)	Títol de ruptura (10^{10} UI/mL de reïna)	η (%)
Capto Q	0,6	8,4	31
Fractogel DEAE	1,6	38,0	61

Taula 6.13. Paràmetres característics de les reïnes avaluades.

D'acord amb els valors de la taula anterior, el medi Fractogel DEAE presenta una millor capacitat de captura, comparada amb la reïna convencional Capto Q. Per tant, aquesta primera serà la reïna seleccionada per realitzar l'aplicació de la tècnica i avaluar el rendiment global de l'etapa de purificació.

6.5.7.2. Aplicació de la tècnica

Una vegada desenvolupat el mètode de purificació, resta per finalitzar l'estudi d'aquesta etapa de captura, aplicar la càrrega de ruptura sobre la mostra semipura. A la pràctica, per assegurar bons resultats, la columna de bescanvi aniónic es carrega entre un 80% i un 90% de la càrrega de ruptura determinada. Per tant, les condicions del mètode desenvolupades fins al moment s'apliquen amb una càrrega òptima de 1,5 mL de volum total, diluïts 1/2 en tampó inicial.

D'altra banda, i en previsió de l'augment d'escala que es produirà en el procés industrial, es decideix modificar el mètode de purificació. Aquest continua basant-se en les condicions avaluades fins al moment, però la principal variació radica en la substitució del patró d'elució en gradient per l'elució en esglaó.

Així, considerant la columna inicialment equilibrada, es carrega el volum de càrrega òptima. Posteriorment, es renta la columna durant 10 CV amb una concentració de sal de 350 mM. Es realitza l'elució amb un primer esglaó, incrementant sobtadament la concentració de sal fins a 500 mM, concentració que es manté durant 10 CV; aquest graó intenta assegurar un únic pic que contingui majoritàriament el virus. Seguidament, un segon esglaó incrementa la concentració de sal a 1.500 mM i tanca l'etapa d'elució. La reïna es renta durant 5 CV mantenint la concentració per assegurar que no resta cap contaminant adsorbit al medi, ara que la càrrega és més alta. Finalment, es reequilibra amb la concentració inicial fins que la línia base del cromatograma recuperi els valors originals. Per portar a terme aquest nou gradient, és necessari un nou tampó d'elució que contingui una concentració 2.000 mM de clorur de sodi.

Es realitzen tres repeticions de l'experiment per verificar la reproductibilitat, les quals se superposen a la Figura 6.32. En aquest cas, per a la posterior anàlisi final, el volum d'elució es recol·lecta en fraccions de 2 mL.

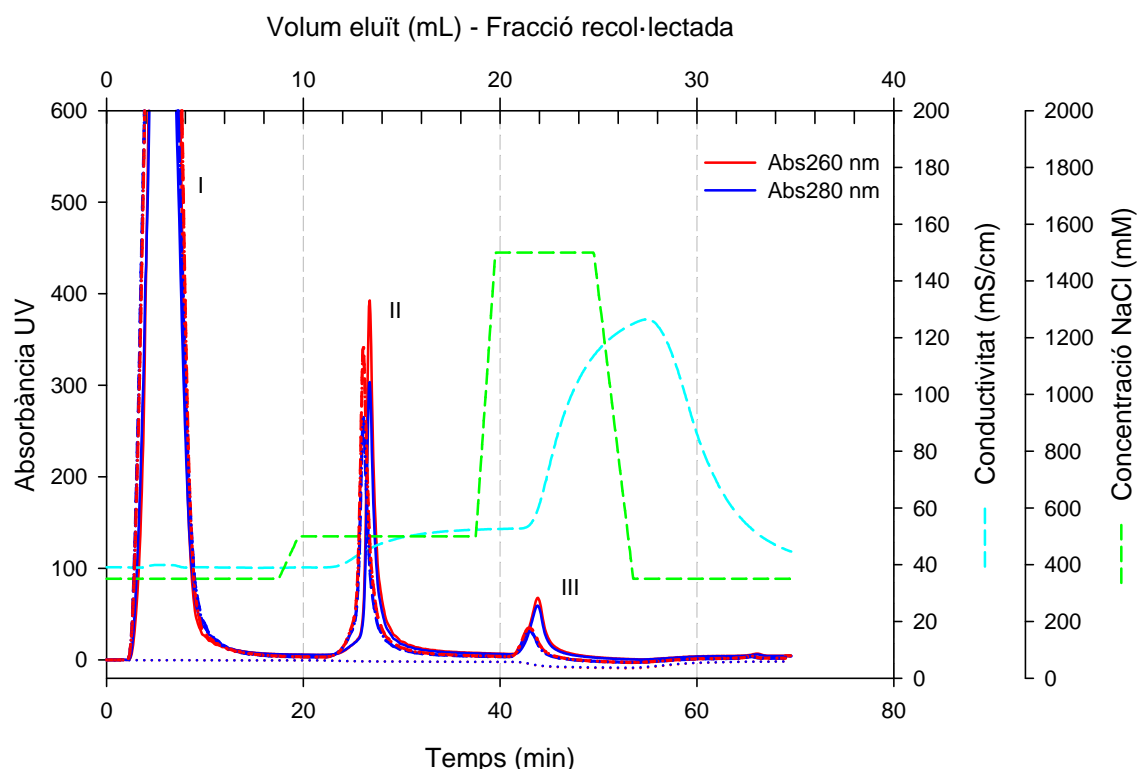


Figura 6.32. Superposició dels tres cromatogrames amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reïna Fractogel DEAE) sobre la càrrega d'adenovirus òptima sense considerar el volum mort. L'elució segueix un perfil en esglaó de 350 – 500 mM NaCl i de 500 – 1.500 mM NaCl. El pic II correspon al vector adenoviral.

La forma dels cromatogrames obtinguts és molt reproducible i similar l'obtinguda a la Figura 6.29. Amb aquestes condicions, ara es pot observar com tots els pics apareguts queden perfectament separats amb un grau de resolució excel·lent que permet recol·lectar-los en fraccions totalment independents.

El virus es troba al pic II amb un temps de retenció 26 minuts en totes les repeticions i es col·lecta en 4 mL, dues fraccions dels 12 mL al 16 mL de volum eluït. L'augment de la càrrega provoca un increment en l'alçada del pic, el qual presenta una relació d'absorbància de 1,29. Un fet destacable és la reducció d'alçada d'absorbància d'aquest pic a mesura que s'incrementa el nombre de repeticions; això es deu a que, tot i el rentat a alta concentració de sal després de l'elució, existeix part del material inicial que queda irreversiblement adsorbit a la columna i fa disminuir la seva capacitat.

En quant al rendiment de l'operació, a la Taula 6.14, s'exposen els resultats de títol víric del material inicial i de les fraccions obtingudes.

Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{11} UI)	Recuperació (%)
Material inicial	1,5	12,72	1,91	100,0
Pic I (<i>Flowthrough</i>)	6	No detectable	-	-
Pic II (Virus)	4	4,29	1,72	90,0
Pic III (Contaminant)	4	No detectable	-	-

Taula 6.14. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de captura amb la càrrega òptima de reïna Fractogel DEAE (valors mitjans de les tres iteracions).

El rendiment de recuperació del vector adenoviral obtingut al pic II del $90,0 \pm 1\%$ ($n=3$) resulta un valor òptim que justifica les modificacions del mètode d'elució i entra dins del rang de dades bibliogràfiques publicades fins al moment [30]. Es perd un 10% del producte injectat a la columna, que justament coincideix amb el valor del volum de ruptura de la Figura 6.31. Aquest bon resultat és possible degut a la forma abrupta de la corba de capacitat avaluada, i justifica la presència indetectable del virus en el pic I i el pic III.

En relació amb els volums finals obtinguts, tot i que la tècnica de cromatografia de bescanvi aniònic és de tipus adsortiu, el material inicial (0,75 mL, sense considerar l'efecte de dilució), en comptes de concentrar-se, es dilueix 5,3 vegades fins als 4 mL de volum total de la fracció recollida. Aquest fet es deu fonamentalment a l'elevada concentració vírica present al material inicial ($1,27 \cdot 10^{11}$ UI/mL).

6.5.7.2.1. Canvi d'escala

Per a processos esporàdics, on es requereix una no massa elevada quantitat de producte purificat de forma ràpida, és sensiblement més senzill repetir la separació portada a terme fins al moment diverses vegades en columnes de dimensions reduïdes i reunir les fraccions d'interès, que endegar un procés de canvi d'escala. No obstant, un procés establert d'obtenció de vectors adenovirals a escala aconsella les mínimes repeticions de les etapes que el

composen, de manera que aquestes han d'afrontar el canvi d'escala.

De forma general, en qualsevol operació unitària, el canvi d'escala és necessari quan s'incrementa el volum a tractar d'aliment, i es realitza mantenint constants els valors d'algunes variables avaluades durant el desenvolupament i augmentant els valors d'unes altres, proporcionalment a l'aliment.

En el cas concret de la cromatografia adsortiva com la de captura, les variables que romanen constants són l'alçada del llit, el flux lineal que circula a través de la columna, la concentració de l'aliment i el mètode de purificació. Aquelles que s'incrementen, a banda de la càrrega, són l'àrea transversal de la columna (com a conseqüència, el seu volum) i el flux volumètric. Aquestes actuacions permeten que els resultats obtinguts a major escala siguin comparables als de la fase de desenvolupament.

La relació entre el flux lineal i el flux volumètric que circulen a través de la columna es pot observar a l'Equació 6.10.

$$Q_L = \frac{Q_V}{A_{col}} = \frac{Q_V}{\frac{\pi \cdot (D_{col})^2}{4}}$$

Equació 6.10. Expressió del cabal de flux lineal o velocitat (Q_L), on: Q_V és el cabal de flux volumètric, A_{col} és l'àrea transversal de la columna, D_{col} és el diàmetre intern de la columna.

En el present treball s'avalua l'augment de la capacitat dinàmica en 10 vegades. A la Taula 6.15 es mostren els principals paràmetres resultants del canvi d'escala.

Paràmetre	Desenvolupament	Aplicació
Càrrega (mL)	1,5	15
Concentració de càrrega (10^{11} UI/mL)	2,22	2,22
Volum de reïna (mL)	1	10
Columna (Diàmetre intern (cm))	Tricorn 5/50 (0,5)	XK 16/20 (1,6)
Alçada del llit* (cm)	5	5
Flux lineal (cm/h)	153	153
Flux volumètric (mL/min)	0,5	5

Taula 6.15. Principals paràmetres del canvi d'escala en l'etapa de captura del vector adenoviral.

*L'alçada del llit es calcula suposant que la porositat del mateix és zero.

Cal considerar que tant la columna de desenvolupament Tricorn 5/50, com la columna d'aplicació XK 16/20 (GE Healthcare, ambdues) es troben dissenyades segons criteris d'escalabilitat.

Es realitzen tres repeticions de l'experiment per verificar la reproductibilitat del canvi d'escala, les quals se superposen i mostren a la Figura 6.33. En aquest cas, per a la posterior anàlisi final, el volum d'elució es recol·lecta en fraccions de 10 mL.

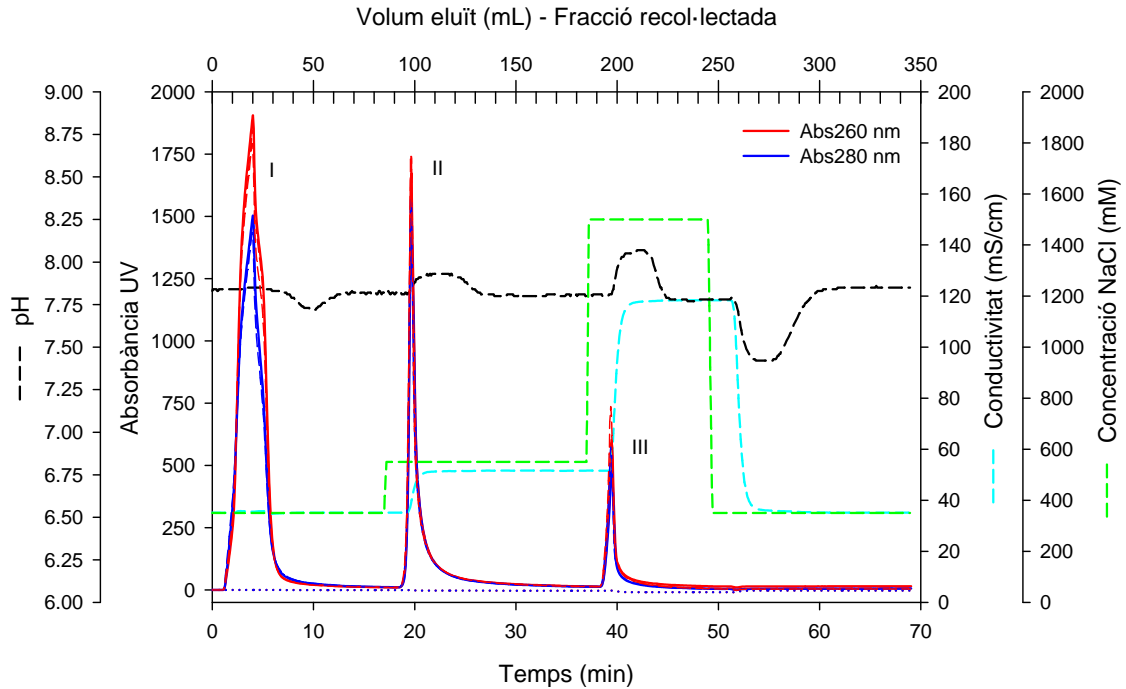


Figura 6.33. Superposició dels tres cromatogrames amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) i pH (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'intercanvi aniónic (reina Fractogel DEAE) sobre la càrrega d'adenovirus òptima amb el canvi d'escala. L'elució segueix un perfil en esglaó de 350 – 500 mM NaCl i de 500 – 1.500 mM NaCl. El pic II correspon al vector adenoviral.

La forma dels cromatogrames és totalment anàloga a la dels presentats a la Figura 6.32, diferenciant-se principalment en la major alçada dels pics d'absorbància i durada del mètode de purificació, degut a l'augment de la càrrega (15 mL) i de les dimensions de la columna XK 16/20, respectivament. La figura anterior incorpora l'evolució del pH al llarg de les separacions, els valors del qual oscil·len entre 7,5 i 8,0 unitats, demostrant l'efectivitat de la solució tampó en assegurar el rang fisiològic durant l'operació. D'altra banda, destaca l'elevadíssim grau de reproductibilitat en els perfils d'absorbància de les tres iteracions.

Com en les anteriors ocasions, l'anàlisi de títol víric, situat a la Taula 6.16, indica el rendiment de recuperació de l'operació amb el canvi d'escala.

Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Material inicial	15	22,20	3,33	100,00
Pic I (<i>Flowthrough</i>)	50	0,2	0,11	3,40
Pic II (Virus)	40	6,13	2,45	73,59
Pic III (Contaminant)	20	0,84	0,17	5,04

Taula 6.16. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de captura, canvi d'escala (valors mitjans de les tres iteracions).

El rendiment mitjà de recuperació de vectors adenovirals obtingut al pic II és de $73,59 \pm 0,3\%$ ($n = 3$). Aquest és un valor elevat, però inferior al valor obtingut amb la càrrega dinàmica ($90,0 \pm 1\%$).

En general, la pèrdua en el percentatge de recuperació és atribuïble al canvi d'escala. Ara, certs factors que durant l'aplicació de la tècnica tenien un efecte molt reduït, s'amplifiquen. Aquest pot ser el cas que certa quantitat de material inicial quedi adsorbida irreversiblement a la reïna a força de reutilitzar-la, o que la circulació de les partícules a través del llit provoqui danys a la seva estructura externa (per exemple a les fibres), com perquè esdevenguin no infectives.

Al igual que en l'experiment on es carrega la capacitat dinàmica de la reïna, el pic II de virus torna a ésser diluït 5,3 vegades respecte el material inicial. Una segona etapa de concentració, inicialment dissenyada per disminuir l'efecte de dilució de l'etapa de polit, mitigarà aquest inconvenient.

L'anàlisi de proteïna total i DNA eliminats durant l'operació es poden observar a la Taula 6.17. i la Taula 6.18.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (µg/mL)	Total (mg)	Eliminació (%)
Material inicial	15	5.342	80,14	0,00
Pic I (<i>Flowthrough</i>)	50	942	47,10	41,33
Pic II (Virus)	40	418	16,73	79,14
Pic III (Contaminant)	20	198	3,96	94,93

Taula 6.17. Resultat de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de captura, canvi d'escala (valors mitjans de les tres iteracions).

Mostra	Volum (mL)	Concentració (ng/mL)	Total (µg)	Eliminació (%)
Material inicial	15	10.501	157,52	0,00
Pic II (Virus)	40	1.925	77,00	51,11

Taula 6.18. Resultat de l'anàlisi de DNA després del procés de captura, canvi d'escala (valors mitjans de les tres iteracions).

El percentatge mitjà d'eliminació de proteïnes al pic II és el més elevat en les etapes del procés de purificació avaluades fins al moment, $79,14 \pm 0,5\%$ ($n = 3$). Cal recordar que l'etapa de captura separa específicament els virions; per tant, ha d'ésser una etapa de purificació molt més selectiva que qualsevol de les avaluades fins al moment. Un fet també destacable és la baixa presència de proteïnes al pic III, aquesta circumstància associada al baix títol del mateix pic, corrobora una composició majoritària en d'àcids nucleics.

Tot i que aquesta etapa no es troba específicament dissenyada per eliminar DNA, l'anàlisi del pic II indica que es produeix una eliminació del $51,11 \pm 2,5\%$ del material inicial, la qual cosa aporta encara més avantatges a l'ús de la cromatografia de bescanvi aniónic en l'etapa de captura.

6.5.8. Segona concentració

L'objectiu principal de la segona concentració torna a ser la reducció del volum de les fraccions obtingudes durant l'operació anterior, com a mínim 10 vegades, mitjançant una etapa d'ultrafiltració. Aquesta compensa l'efecte de dilució, inicialment previst, en l'etapa final de polit, però ja demostrat en l'etapa de captura.

El volum a tractar és de 120 mL, de manera que s'inclou dins del rang operacional del sistema Midjet Advanced i, per tant, aquesta és la unitat utilitzada. El filtre de fibres buides és idèntic a l'emprat durant la primera concentració: tipus MidGee de 16 cm² d'àrea i 100 kDa NMWC, el qual assegura la mínima pèrdua de material víric en el permeat.

Es realitza un únic experiment on, d'acord amb l'experiència prèvia, el flux d'operació es fixa inicialment en 64 LMH, i l'operació es perllonga durant 64 minuts sense pèrdua ostensible del flux de permeat, ni augment de la pressió transmembrana. El volum final obtingut és de 12 mL, de manera que el factor de concentració és exactament de 10 vegades.

A la Taula 6.19, es mostren les dades de recuperació de vectors adenovirals durant la segona concentració.

Mostra	Volum (mL)	Títol (10 ¹⁰ UI/mL)	Total (10 ¹² UI)	Recuperació (%)
Material inicial	120	4,66	5,59	100,00
Retingut	12	34,23	4,11	73,54
Permeat	138	No detectable	-	-

Taula 6.19. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de segona concentració.

Durant l'aplicació d'aquesta etapa es recupera un 73,54 ± 0,2% del vector present al material inicial. Aquest rendiment és superior al publicat per Kamen i col. d'un 50%, i molt similar a l'obtingut per Peixoto i col. d'un 70%. La pèrdua de partícules infectives, no detectada al permeat, d'aproximadament el 30% s'atribueix a diverses raons. D'una banda, a les altes concentracions d'adenovirus en les proximitats de la paret de la membrana, els quals podrien agregar i quedar-hi adsorbits no específicament i, d'altra banda, a l'estrès tallant que malmet els virions i els fa perdre infectivitat, en circular per l'interior de les fibres del filtre [26, 53].

Els resultats d'eliminació de proteïna i DNA durant l'operació es recullen a la Taula 6.20 i la Taula 6.21 a continuació.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (µg/mL)	Total (mg)	Eliminació (%)
Material inicial	120	368	44,14	0,00
Retingut	12	3.136	37,63	14,75
Permeat	138	No detectable		

Taula 6.20. Resultat de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de segona concentració.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (ng/mL)	Total (µg)	Eliminació (%)
Material inicial	120	1.925	231,00	0,00
Retingut	12	13.908	166,90	27,75

Taula 6.21. Resultat de l'anàlisi de DNA després del procés de segona concentració.

Els percentatges d'eliminació de proteïnes i DNA són baixos en comparació amb resultats previs. Cal recordar que la ultrafiltració es troba específicament dissenyada per concentrar i que el material inicial ja ha superat etapes prèvies com el tàndem concentració-tractament d'àcids nucleics-condicionament, específicament dissenyat per eliminar bona part de les proteïnes i dels àcids nucleics.

6.5.9. Polit

Com s'ha comentat a l'apartat 6.3, l'etapa de polit és l'única que integra la secció de purificació final. Aquesta serveix per eliminar de forma acurada aquelles impureses més complexes d'extreure per ésser molt semblants al producte final. Un producte final que, per altra banda, cal que tingui un elevat grau de puresa per ésser administrat en éssers humans.

La important mida i, en el seu defecte, el pes molecular del vector adenoviral resulten les propietats més interessants per ser aprofitades durant aquesta etapa, ja que aquestes permeten separar els virions madurs de contaminants similars, però amb dimensions diferents.

La cromatografia d'exclusió molecular o gel filtració és l'operació bàsica ideal, perquè utilitza l'estructura altament porosa de les partícules que integren la reïna per actuar com un garbell molecular (veure Figura 6.34). Així, les partícules d'una mida superior, com són els adenovirus, queden excloses de la major part dels porus que integren les perles de medi i elueixen de forma ràpida en l'anomenat volum buit de la columna (*void volume*). A mesura que la mida de la resta de contaminants es redueix, aquests tenen accés a porus de dimensions cada vegada inferiors, quedant retardats a l'interior de la columna, tot eluint amb un temps superior.

Donat que és l'única cromatografia de tipus no adsortiu, no existeix cap mena d'unió o enllaç entre els components que integren la mostra a tractar i les partícules de la reïna. Això fa que es tracti d'un mètode de separació poc agressiu amb el vector adenoviral.

L'aplicació d'aquest mètode com a part de la secció de purificació intermèdia ofereix rendiments de recuperació baixos, entre el 15% i el 20%, amb pics d'elució poc resolts [28]. En canvi, els millors rendiments obtinguts, superiors al 90% [30], provenen d'aplicar aquesta tècnica com a etapa de purificació final, un cop la mostra esdevé semipura, tal i com es reflecteix a la Taula 6.4 [54]. D'altra banda, aquest mètode de separació permet simultàniament fer el canvi del tampó i l'eliminació de les sals utilitzades durant l'etapa anterior d'intercanvi aniónic; pas previ a les fases de formulació i estabilització del producte per al seu emmagatzematge final.

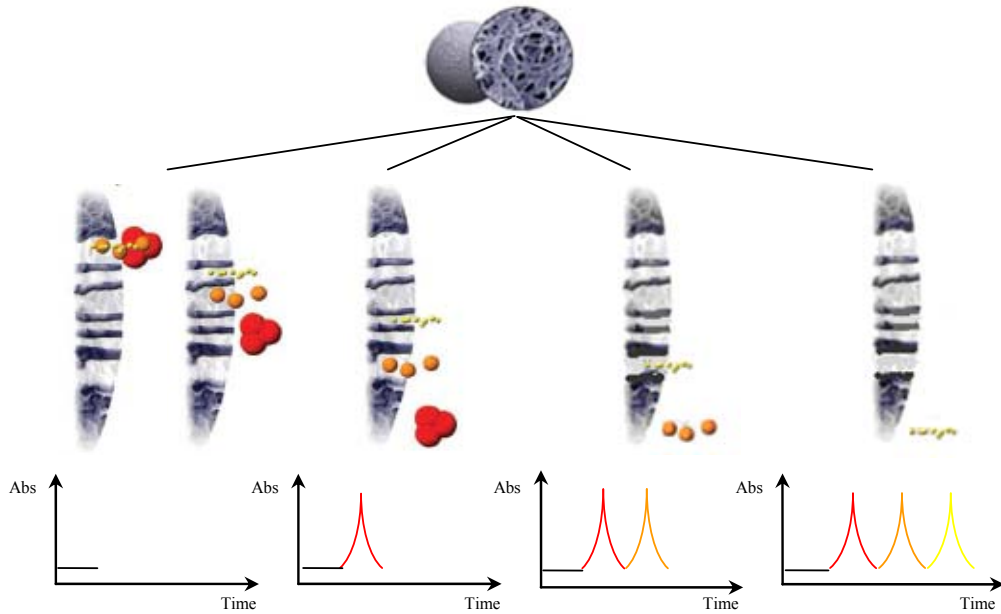


Figura 6.34. Principi bàsic de la cromatografia d'exclusió molecular (gel filtració): els components queden purificats eluint en ordre decreixent de mida o pes molecular. Així, primer se separa el component de color vermell, segon el component de color taronja i, per últim, el component de color groc.

Per tal d'obtenir el millor grau de separació entre pics o resolució, és a dir, obtenir un pic ben definit de producte preferiblement en el volum buit, cal considerar una sèrie de factors:

- Reïna: com s'ha dit anteriorment, la reïna que conforma la fase estacionària es troba composta per partícules altament poroses seleccionades per la seva estabilitat química i falta de reactivitat. La mida dels porus i la seva distribució de grandària dins d'una perla de gel són controlades per produir una àmplia varietat de medis amb diferents selectivitats, és a dir, amb diferents rangs de pes molecular on es poden separar els components segons la seva mida.

La selectivitat depèn exclusivament de la distribució de mida dels porus de les perles que integren la reïna, i es determina per mitjà de la corba de selectivitat. Aquesta s'obté representant el coeficient de partició (K_{av}) front al pes molecular d'una sèrie de proteïnes estàndard en eix semilogarítmic (veure Figura 6.35).

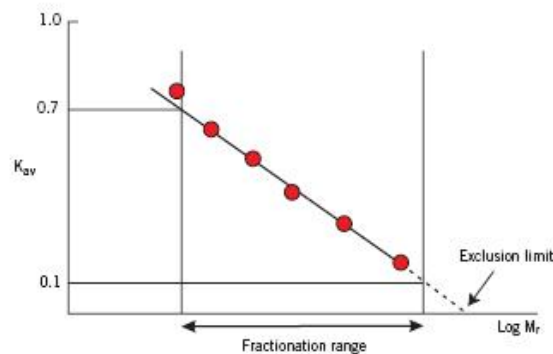


Figura 6.35. Exemple de corba de selectivitat. Definició del rang de fraccionament i del límit d'exclusió molecular [54].

Com s'observa, les corbes de selectivitat són properes a la linealitat en el rang $K_{av} = 0,1 - 0,7$. Aquesta zona determina el rang de fraccionament d'un medi de gel filtració, és a dir, el rang de substàncies amb pesos moleculars que els permeten accedir parcialment als porus de la matriu i ésser separades per fraccionament. El límit de pes molecular que tenen els components exclosos dels porus i que elueixen en el volum buit, també es determina a partir de la corba de selectivitat: allà on K_{av} és igual a zero. Aquest límit és l'anomenat límit d'exclusió molecular.

El coeficient de partició es calcula a partir de l'Equació 6.11, considerant els volums principals d'un cromatograma d'exclusió molecular (veure Figura 6.36), i indica la capacitat d'accedir als porus de la reïna que té un determinat component. Com més petit sigui el seu valor, menys accés es donarà.

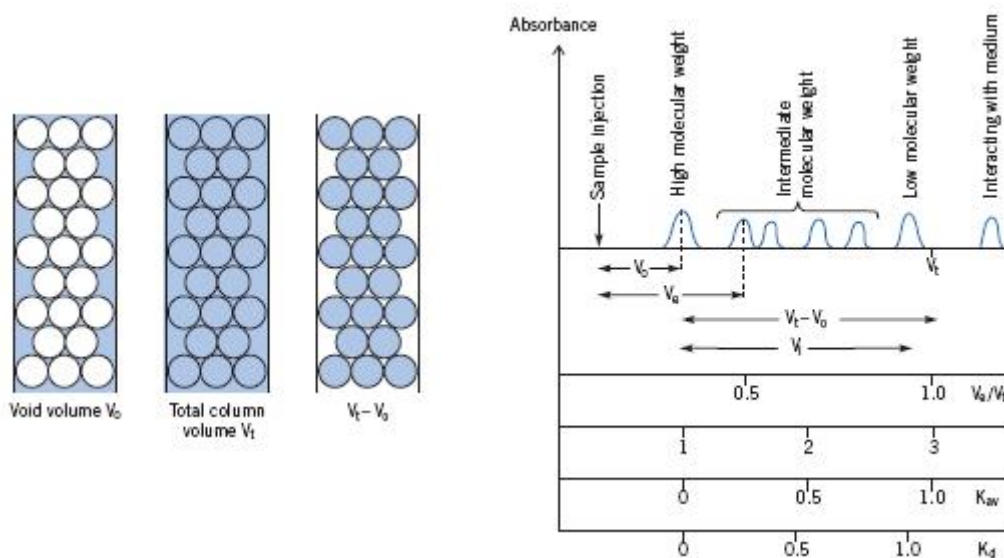


Figura 6.36. Volums principals d'una columna d'exclusió molecular: V_e és el volum d'elució; V_0 és el volum buit; V_t és el volum total de la columna; $(V_t - V_0)$ és el volum de sòlid més el volum de porus de la reïna [54].

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Equació 6.11. Expressió per al càlcul del coeficient de partició (K_{av}), on: V_e és el volum d'elució, V_0 és el volum buit, V_t és el volum total de la columna.

De l'equació anterior es pot observar que si $V_e = V_0$, llavors $K_{av} = 0$: el component elueix en el volum buit. En canvi si $V_e \geq V_t$, llavors $K_{av} \geq 1$ i el component resta adsorbit a la reïna.

- Dimensions de la columna: degut a la naturalesa no adsortiva de la tècnica, l'alçada del llit reblert a l'interior de la columna afecta el grau de resolució, per això les columnes emprades en cromatografia d'exclusió molecular tenen més alçada que amplada. En concret, el grau de resolució augmenta en proporció a l'arrel quadrada de l'alçada del llit;

així per exemple, si és dobla l'alçada d'una columna, tot mantenint-se la resta de paràmetres operacionals, aquesta teòricament augmenta la seva resolució en un 40% [54].

- Velocitat de flux: les mostres són eluïdes de la columna seguint un perfil isocràtic. El front de la fase mòbil ha de permetre la difusió i contradifusió dels components al sí dels porus de la reïna; de manera que el grau de resolució decreixerà a mesura que la velocitat de flux s'incrementi. Els valors recomanats de flux són funció de la columna i de la reïna emprats i s'han de determinar empíricament. En qualsevol cas, la velocitat de flux optimitzada no evitarà mai el principal inconvenient que presenta aquesta tècnica: la dilució de la mostra aplicada a la columna d'entre 2 i 4 vegades [30].
- Volum de la mostra: com a dada a considerar, s'aconsella carregar un volum de mostra entre el 0,5% i el 4% del volum total de la columna, si la utilització de la tècnica té finalitats analítiques [54]; tot i que, si es tracta d'una aplicació preparativa com en el present estudi, aquests valors poden augmentar fins al 10% [30]. Com a conseqüència, el volum de mostra que es vol tractar determinarà la mida de la columna a utilitzar.
- Viscositat de la mostra: el grau de resolució minva amb la viscositat de la mostra, ja que aquesta última disminueix la velocitat de circulació dels components a l'interior de la columna i perjudica la seva separació. Com a dada a considerar, s'aconsella no superar valors de 5 – 10 mg/mL de proteïna a l'aliment, perquè la resolució no es vegi afectada [1]. Tot i això, existeixen altres autors que augmenten aquesta concentració fins als 70 mg/mL [54].

6.5.9.1. Aplicació de la tècnica

La senzillesa abans esmentada de la tècnica també permet aplicar-la de forma ràpida i directa, sense els complexos desenvolupaments com en el cas de la cromatografia de bescanvi aniònic, basant-se en els paràmetres, tot just descrits, i en els recomanats pel fabricant del medi. Des d'un punt de vista operacional, els experiments de cromatografia d'exclusió molecular novament es realitzen a baixa pressió gràcies a la utilització del cromatògraf FPLC, ÄKTAexplorer.

El medi seleccionat per a la cromatografia de gel filtració és la reïna Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). La seva matriu es troba composta per un 6% d'agarosa altament reticulada, la qual proporciona una elevada estabilitat fisicoquímica i rígidesa. Precisament és la rígidesa la que permet a la reïna suportar elevats fluxos lineals d'operació de fins a 300 cm/h sense disminuir el grau de resolució dels pics. Aquest fet fa d'aquesta matriu un suport idoni perquè sigui emprada a escala industrial i es processin importants volums d'aliment en temps reduït. El seu límit d'exclusió per a proteïnes globulars i per a dextrans és de $4 \cdot 10^6$ Da i $2 \cdot 10^6$ Da respectivament, a priori valors suficients per eluir l'adenovirus en el volum buit de la columna [55].

La reïna es troba reblerta en una columna XK 16/70 (GE Healthcare), la qual disposa d'un llit fix amb un volum de 130 mL. Per tal d'evitar superar els límits de sobrepressió de la columna (0,5 MPa), mantenir un bon grau de resolució en els pics eluïts i evitar una dilució excessiva

del material inicial, es decideix utilitzar un cabal 2 mL/min (70 cm/h).

Com s'ha comentat anteriorment, el mètode de purificació és molt simple, ja que només consisteix en l'equilibrat de la columna i en l'elució isocràtica dels components presents a la mostra injectada durant 1 CV. El tampó emprat en aquestes fases és de vital importància, ja que la seva composició té un efecte directe sobre l'estabilitat del virus pur.

L'administració del producte per via parenteral en forma de líquid i el seu emmagatzematge refrigerat entre 2 °C i 8 °C s'està imposant a la liofilització o la congelació com alternatives històricament emprades. D'acord amb aquest fet, Altaras i col. fan un ampli recull d'estudis d'estabilitat i cinètiques d'inactivació adenoviral, en base a diferents formulacions [12]. Bàsicament, es tracta de solucions isotòniques amb concentracions de sal inferiors a 300 mM i algun component crioprotector com el glicerol o la sacarosa, els quals, d'una banda, augmenten l'estabilitat del virus amb el reforç de les proteïnes de la càpside i, d'altra banda, augmenten la viscositat de la solució d'emmagatzematge, reduint les col·lisions del virions i la seva possible agregació [56, 57]. Així, en el mètode de purificació a aplicar es decideix aprofitar la solució tampó inicial emprada en l'etapa de captura i suplementar-la amb una concentració de clorur de sodi de 150 mM.

Finalment, el volum de mostra aplicat a la columna és de 8,5 mL de vector semipur, el qual representa un 6,5% del volum total de la columna i s'encabeix dins del rang aconsellable. Degut a l'elevada carrega injectada, es realitza un únic experiment d'exclusió molecular. De manera anàloga als anteriors, per a la posterior anàlisi final es recol·lecten fraccions de 5 mL cadascuna. El resultat es mostra al cromatograma de la Figura 6.37.

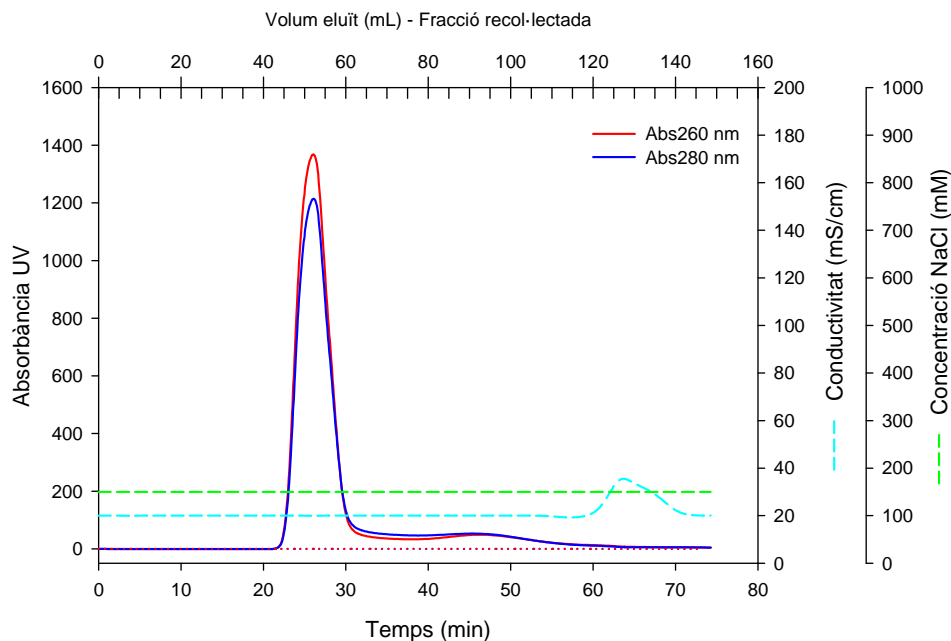


Figura 6.37. Cromatograma amb perfils d'absorbància a 260 nm (—) i 280 nm (—), conductivitat (mS/cm) (—) i concentració de sal (mM) (—) procedents de l'aplicació de la cromatografia d'exclusió molecular (reïna Sepharose 6FF) sobre una mostra d'adenovirus semipur. Superposició del blanc (línies de punts). L'elució segueix un perfil isocràtic de 150 mM NaCl.

En l'anterior cromatograma destaca la presència d'un únic pic molt ben definit, corresponent al vector adenoviral, i situat en un temps de retenció de 26 minuts, el qual es recollia en 15 mL, equivalents a tres fraccions aparegudes entre 45 mL i 60 mL de volum eluït. Per tant, queda patent l'increment de volum experimentat entre el material inicial (8,5 mL) i el pic de virus (15 mL), la qual corrobora l'efecte diluent en 1,8 vegades, inherent i inevitable a l'aplicació d'aquest tipus de cromatografia no adsortiva.

La determinació empírica del volum buit de la columna utilitzant com a marcador el blau dextrà, el qual presenta un pes molecular de $2 \cdot 10^6$ Da, és de 50 mL (María Mercedes Segura 2008, dada no publicada). Considerant aquesta dada i tenint en compte el pes molecular elevat del virió ($167 \cdot 10^6$ Da), es podria esperar que les partícules abandonessin la columna amb anterioritat al moment que ho fan. No obstant, aquest fet possiblement no té lloc degut al baix coeficient de difusió viral que reté els virus dins de la columna [12].

Entre els minuts 45 i 60 es produeix un lleu augment de les corbes d'absorbància i es recullen 30 mL que contenen la major part dels contaminants de composició heterogènia presents al material inicial. Pel moment d'elució, es pot afirmar que la seva mida és molt inferior a la de les partícules adenovirals, ja que han tingut molt accés al volum de porus del medi. Finalment, hi ha un augment en la conductivitat i una baixada forta d'absorbància degut a l'elució dels ions Na^+ i Cl^- de la sal, que accedeixen a la totalitat dels porus disponibles de la reïna.

Pel que fa al rendiment global de l'etapa de polit, les dades de l'anàlisi de titulació vírica referents al material inicial i a les fraccions obtingudes, s'indiquen a la Taula 6.22.

Mostra	Volum (mL)	Títol (10^{10} UI/mL)	Total (10^{12} UI)	Recuperació (%)
Material inicial	8,5	34,22	2,91	100,00
Pic virus	15	17,69	2,65	91,06
Contaminant	20	0,02	0,004	0,14

Taula 6.22. Resultat de l'anàlisi de titulació vírica després del procés de polit.

El rendiment de recuperació obtingut per al vector és de $91,06 \pm 0,4\%$, valor que es troba dins dels rangs bibliogràfics publicats [26, 28, 34].

Tot i que seria aconsellable incrementar la reproductibilitat de la tècnica per disposar de més dades, es pot concloure que la reïna i els paràmetres que configuren el mètode de purificació durant l'etapa de polit són correctes. Com en l'anterior etapa de captura, la pèrdua de recuperació s'atribueix a l'estrès mecànic que pateixen els virions en circular a través del llit i, no a l'adsorció irreversible de partícules, ja que en aquest tipus de cromatografia la interacció entre la mostra i les partícules de medi és molt poc habitual.

D'altra banda, pel que fa a l'eliminació de proteïna total i DNA contaminants, els resultats es mostren a continuació, a la Taula 6.23 i Taula 6.24.

Mostra	Volum (mL)	Concentració ($\mu\text{g/mL}$)	Total (mg)	Eliminació (%)
Material inicial	8,5	3.136	26,66	0,00
Pic virus	15	512	7,68	71,08
Contaminant	20	205	4,10	84,65

Taula 6.23. Resultat de l'anàlisi de proteïnes totals després del procés de polit.

Mostra	Volum (mL)	Concentració (ng/mL)	Total (μg)	Eliminació (%)
Material inicial	8,5	13.908	118,22	0,00
Pic virus	15	405	6,08	94,86

Taula 6.24. Resultat de l'anàlisi de DNA després del procés de polit.

El percentatge d'eliminació de proteïnes al pic de virus és del 71,08%, un valor elevat ja que la mida de les proteïnes restants al final del procés de purificació és prou reduïda com perquè accedeixin als porus del medi i esdevinguin ben separades.

Per la mateixa raó, el percentatge d'eliminació de DNA del 94.86% també resulta molt important. Tenint en compte que en el present cas d'estudi no és possible disposar dels experiments que certifiquin quin és el volum per establir una dosi, la qual depèn específicament de l'aplicació terapèutica, és complex determinar si la presència de DNA en el producte final (405 ± 147 ng/mL) compleix amb el grau d'eliminació establert per les entitats reguladores, de fins a 10 ng/dosi (veure apartat 6.5.5).

6.5.10. Taula de purificació

En el cas de l'estratègia escalable, els rendiments de recuperació vírica i d'eliminació dels principals contaminants (proteïnes i DNA) de cadascuna de les etapes que mostra la taula de purificació (veure Taula 6.25), sí que són extrapolables a l'escala de 10 L, ja que totes i cadascuna són escalables. Aquest fet justifica la posada a punt de l'estratègia amb alíquotes d'un volum menor, tot reduint el temps de desenvolupament.

En referència als valors calculats, l'activitat específica del virus augmenta des d'un valor inicial de $2,29 \cdot 10^{10}$ UI/mg proteïna fins a $30,70 \cdot 10^{10}$ UI/mg proteïna, després de l'etapa de polit. A nivell global, això es tradueix en un factor de purificació de 13,9. Els valors individuals d'aquest paràmetre distingeixen perfectament aquelles etapes, com les de concentració o clarificació, amb valors propers a 1, respecte les etapes de cromatografia que augmenten el grau de puresa del producte, amb valors superiors a 3.

Pel que fa al rendiment de recuperació vírica és del 40%. Considerant els valors de la bibliografia, es troba dins del rang publicat per diversos autors: per sota de Green i col. (entre 57% i 54%) [34], igualant el valor obtingut per Blanche i col. [29] i per sobre dels valors publicats per Peixoto i col., Huyghe i col. i Arcand i col. del 32%, 22% i 4% respectivament [25, 28, 53]. Els valors d'eliminació de proteïna i DNA són elevats (97% i 99,9%, respectivament).

Etapa	Volum (mL)	Títol víric (10^{10} UI/mL)	Proteïna (mg/mL)	DNA (μ g/mL)	Activitat específica del virus (10^{10} UI/mg proteïna)
Cultiu cel·lular Lisi cel·lular	10.000	4,30	1,88	18,19	2,29
Clarificació	10.000	4,30	1,69	16,81	2,54
Primera Concentració Tractament d'àcids nucleics Condicionament	1.053	33,50	10,36	10,54	3,23
Captura	5.263	4,96	0,44	1,03	11,40
Segona concentració	526	36,20	3,70	7,44	9,78
Polít	877	19,80	0,64	0,23	30,70

Etapa	Factor de concentració (X)	Recuperació de virus (%)	Eliminació de proteïna (%)	Eliminació de DNA (%)	Factor de purificació (X)
Cultiu cel·lular Lisi cel·lular	1,0	100	0,0	0,0	1,0
Clarificació	1,0	100	9,8	7,6	1,1
Concentració Tractament d'àcids nucleics Condicionament	9,5	82	35,5	93,4	1,3
Captura	0,2	74	79,0	51,1	3,5
Segona Concentració	10,0	73	15,0	27,8	0,9
Polít	0,6	91	71,0	94,9	3,1

Global	11,4	40,3	97,0	99,9	13,9
---------------	------	------	------	------	------

Taula 6.25. Taula de purificació: estratègia de purificació escalable.

Finalment, el factor de concentració és de 11,4 vegades, reduint el volum inicial de 10 L fins als 877 mL. Es podrien plantejar alternatives per millorar-lo. Per exemple, substituir la cromatografia d'exclusió molecular de l'etapa de polit per una nova etapa de cromatografia adsortiva que concentri el producte [29]. D'altra banda, actualment s'estan realitzant avenços en l'aplicació de reïnes de nova generació que superin la capacitat de les reïnes tentaculars; el cas més representatiu és el de les reïnes monolítiques. Aquestes no conformen columnes amb un llit reblert de partícules micromètriques, sinó que són columnes compactes d'una única peça de material extremadament porós [58]. La seva aplicació en la separació de vectors adenovirals tot just comença a publicar-se amb assajos analítics, però encara sense rendiments de recuperació [59]. Tanmateix, cal tenir molt present que no és aconsellable augmentar el factor de concentració il·limitadament, ja que d'acord amb el treball publicat per Galdiero i col. comencen a observar-se problemes d'agregació dels virions a partir d'una concentració de $5 \cdot 10^{11}$ UI/mL [60], valor proper al que s'obté al final del procés ($1,98 \cdot 10^{11}$ UI/mL).

6.6. Comparació d'estratègies

A banda que la viabilitat tècnica de les dues estratègies depengui de l'escala a la qual té lloc el procés de cultiu, a la Taula 6.26 es comparen els principals paràmetres globals de purificació.

Paràmetre	Estratègia no escalable	Estratègia escalable
Nombre d'etapes	5	9
Factor de concentració (X)	90	11,4
Recuperació de virus (%)	12,1	40,3
Eliminació de proteïna (%)	99,5	97
Eliminació de DNA (%)	-	99,9
Factor de purificació (X)	24,1	13,9

Taula 6.26. Comparació dels paràmetres de purificació globals de les estratègies avaluades.

Destaca el menor rendiment global de recuperació vírica en l'estratègia no escalable (12%), respecte el 40% obtingut amb l'estratègia de purificació escalable. No obstant, els factors de concentració i de purificació són superiors aproximadament 9 i 1,7 vegades respectivament. Com a conclusió, l'estratègia no escalable recupera el vector adenoviral amb un elevat grau de puresa, ja que es recol·lecta la banda amb la densitat de virus madur, però, a canvi d'un procés que triga més, i on es perd més infectivitat.

Els rendiments d'eliminació de proteïnes contaminants són molt similars en ambdues estratègies, encara que lleugerament superior en el cas de la no escalable. Pel que respecta al DNA, tot i que no s'ha calculat el seu rendiment d'eliminació en aquesta última estratègia, les diferències de densitat entre els àcids nucleics (aproximadament 1,7 g/mL) i el virió (aproximadament 1,3 g/mL) fan preveure també un elevat grau d'eliminació, similar a l'observat en el cas de les proteïnes [61].

6.7. Caracterització final del vector: puresa

La caracterització final del vector purificat, tot avaluant la presència de traces de components, ja siguin cel·lulars, virals o d'algun reactiu emprat durant el procés de producció o purificació, és de vital importància per satisfer les normes reguladores i per a la seguretat del pacient a qui s'administrarà el producte final [12]. Especialment quan el procés d'obtenció de vectors adenovirals es troba sota normes GMP, la caracterització es troba sotmesa a un estricte control de qualitat, principalment, del producte final, però també de tots i cadascun dels reactius que integren el procés i, fins i tot, de sí mateix. Un ampli espectre de propietats com la puresa, identitat, estabilitat, potència, etc... es determinen amb diverses tècniques analítiques per assegurar que la dosi de producte final compleix estrictament amb les especificacions de les agències reguladores més importants (FDA i EMEA).

En el present treball, bàsicament s'avalua el grau de puresa de la mostres obtingudes, mitjançant l'aplicació de dues tècniques analítiques: l'anàlisi de proteïnes i la microscòpia electrònica.

6.7.1. Anàlisi de proteïnes

Els mètodes més fàcilment implementables per avaluar la puresa de les mostres obtingudes durant el procés de purificació es basen en la detecció de les proteïnes víriques mitjançant l'electroforesi. D'entre aquests mètodes destaquen l'anàlisi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i el Western Blot.

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) és una tècnica àmpliament utilitzada per a la separació de proteïnes d'acord amb els seus pesos moleculars. La mostra a examinar es tracta inicialment amb SDS, un detergent aniònic que desnatura les proteïnes, eliminant les estructures secundària i terciària, i confereix a cada proteïna una càrrega negativa, uniforme i proporcional al seu pes molecular. De manera que, en sotmetre la mostra a un camp elèctric dins del gel, el fraccionament de les proteïnes, en forma de bandes, obeeix exclusivament als diferents pesos moleculars. Posteriorment, les bandes es tenyeixen utilitzant Coomassie Blue o plata, essent aquesta última molt més sensible.

El Western Blot afegeix a l'electroforesi una etapa de transferència de les proteïnes a una membrana, habitualment de nitrocel·lulosa, on aquestes són detectades utilitzant anticossos específics per a una única proteïna o diverses. D'aquesta manera, l'anàlisi de Western Blot amb anticossos policlonals contra proteïnes específiques d'adenovirus serotipus 5 identifica sense lloc a dubtes la presència de les proteïnes virals en una mescla complexa.

Els principals inconvenients que presenten ambdues tècniques es relacionen amb la concentració de proteïnes a les mostres a analitzar, ja que mostres massa diluïdes poden portar a falsos negatius, i amb la interferència d'altres concentracions de sal [28].

L'anàlisi de SDS-PAGE i la posterior tinció de plata de les etapes que configuren les dues estratègies de purificació avaluades en aquest capítol es mostren a la Figura 6.38.

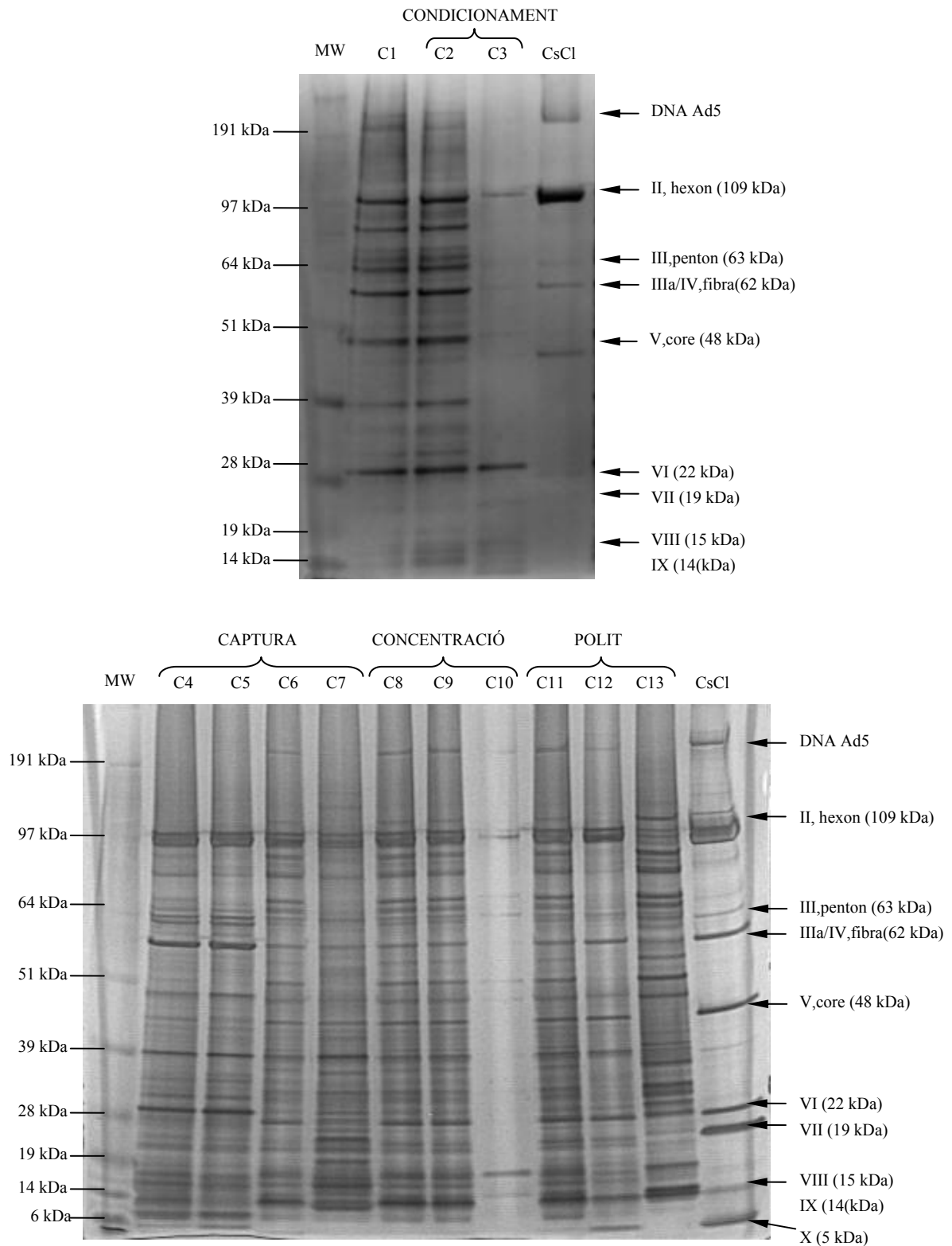


Figura 6.38. Anàlisi de la purificació mitjançant SDS-PAGE amb tinció de plata. Perfils de proteïnes obtinguts amb les mostres procedents de les estratègies de purificació escalable i no escalable. MW: Marcador de pes molecular. C1: Clarificat. C2: Retingut diafiltrat. C3: Permeat diafiltrat. C4: Material inicial (Captura). C5: *Flowthrough* (Captura). C6: Pic de virus semipur (Captura). C7: Pic de contaminant (Captura). C8: Material inicial (Segona concentració). C9: Retingut (Segona concentració). C10: Permeat (Segona concentració). C11: Material inicial (Polit). C12: Pic de virus pur (Polit). C13: Pic de contaminant (Polit). CsCl: Virus pur (Estratègia no escalable). Proteïna carregada: 1,3 µg/carril.

Degut a que els virions són partícules complexes formades per proteïnes, DNA i carbohidrats, els gels no rebel·len una única banda per a les mostres injectades en cadascun dels carrils, sinó que proporcionen patrons bastant complexes. L'única manera de dilucidar si les bandes corresponen a proteïnes adenovirals és per comparació amb una mostra de referència de virus pur, que en aquest cas es considera el virus procedent de l'estratègia no escalable basada en la ultracentrifugació en clorur de cesi (carril CsCl).

Al llarg del procés de purificació escalable es van eliminant progressivament les impureses proteiques d'origen cel·lular i viral, amb la consegüent reducció del nombre de bandes presents en els carrils i/o la disminució de la seva intensitat fins a ésser comparables amb la mostra de referència. D'aquesta manera, el producte guanya puresa. Aquest és el cas del patró de bandes del pic de virus pur procedent de l'etapa de polit (carril C12); essent principalment identificables les bandes que conformen les proteïnes estructurals del vector adenoviral: hexon, penton, fibra, V, VI, VII, VIII, IX i X [19]. De totes maneres, és possible identificar una lleu contaminació de fons, si es compara amb la mostra obtinguda per ultracentrifugació. Aquest fet no fa més que corroborar el millor factor de puresa que presenta l'estratègia no escalable respecte l'escalable (veure Taula 6.26), i al qual haurà de tendir aquesta última.

L'anàlisi de Western Blot desenvolupat amb anticossos policlonals contra proteïnes específiques d'adenovirus serotipus 5 es mostra a la Figura 6.39.

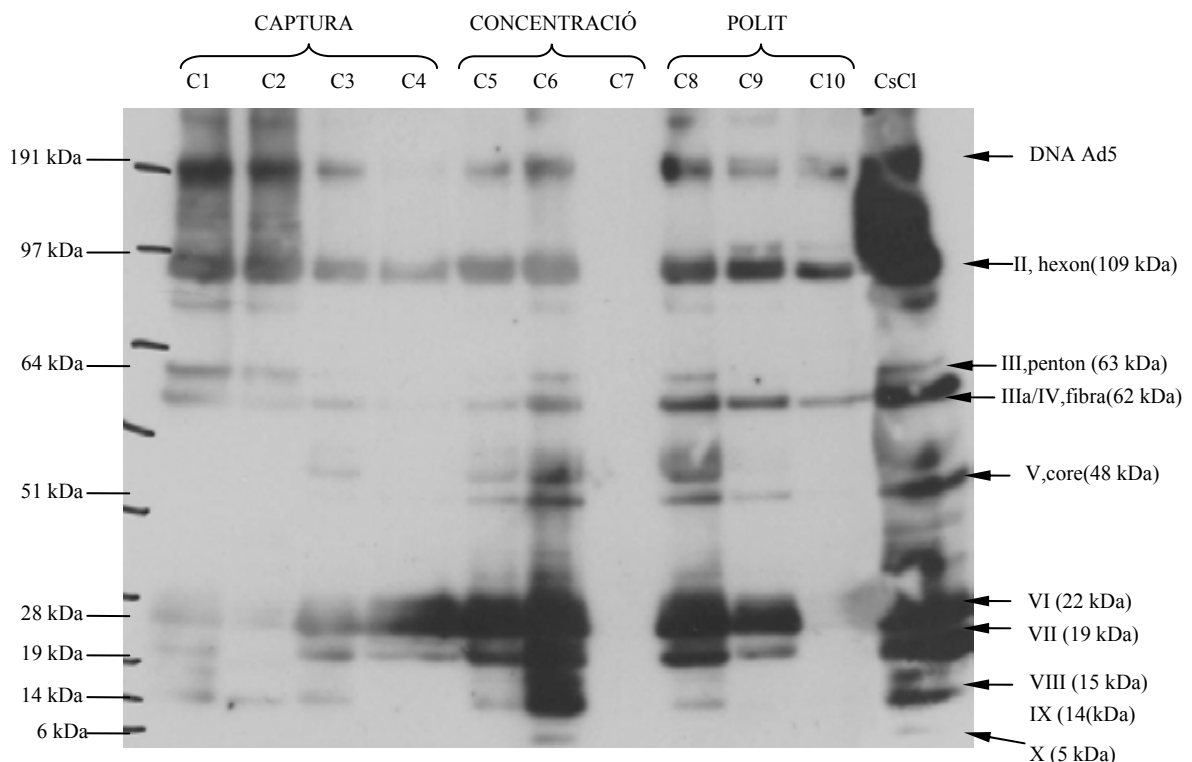


Figura 6.39. Anàlisi de la purificació mitjançant Western Blot contra proteïnes específiques d'adenovirus serotipus 5. Perfils de proteïnes obtinguts amb les principals mostres procedents de les estratègies de purificació escalable i no escalable. C1: Mostra inicial (Captura). C2: *Flowthrough* (Captura). C3: Pic de virus semipur (Captura). C4: Pic de contaminant (Captura). C5: Mostra inicial (Segona concentració). C6: Retingut (Segona concentració). C7: Permeat (Segona concentració). C8: Mostra inicial (Polit). C9: Pic de virus pur (Polit). C10: Pic de contaminant (Polit). CsCl: Virus pur (estratègia no escalable).

Les mostres analitzades també presenten diferències en els seus patrons de bandes al llarg del procés de purificació. Tot i això, aquesta anàlisi confirma la identitat del producte purificat (carril 9) per comparació, novament, amb el patró de referència (carril CsCl) obtingut per ultracentrifugació, on es troben novament presents les proteïnes que conformen l'estructura del virió. Les principals diferències es troben en les intensitats de les bandes de menor pes molecular que oscil·len entre 51 kDa i 6 kDa, ja que es corresponen amb proteïnes que tenen una menor presència en l'estructura del virió.

Com s'ha vist, totes les fraccions analitzades per SDS-PAGE i Western Blot són positives, en major o menor grau, a la presència de proteïnes virals en forma de banda. Tanmateix, la detecció d'aquestes proteïnes no necessàriament indica la presència de virions infectius que hagin completat la totalitat del seu procés de maduració. Al contrari, existeix una fracció molt important de virions no infectius integrada per una població molt heterogènia de partícules, les quals o bé no han completat el seu procés de maduració o bé l'estructura de les quals ha estat degradada al llarg de la purificació. D'entre aquelles no infectives en destaquen, per la seva morfologia tan singular, les càpsides que no presenten genoma a l'interior, és a dir, les càpsides buides.

De forma simplificada, la Figura 6.40 posa de manifest la complexa mescla de partícules que componen qualsevol mostra purificada, cadascuna de les quals amb propietats i estructures diferents.

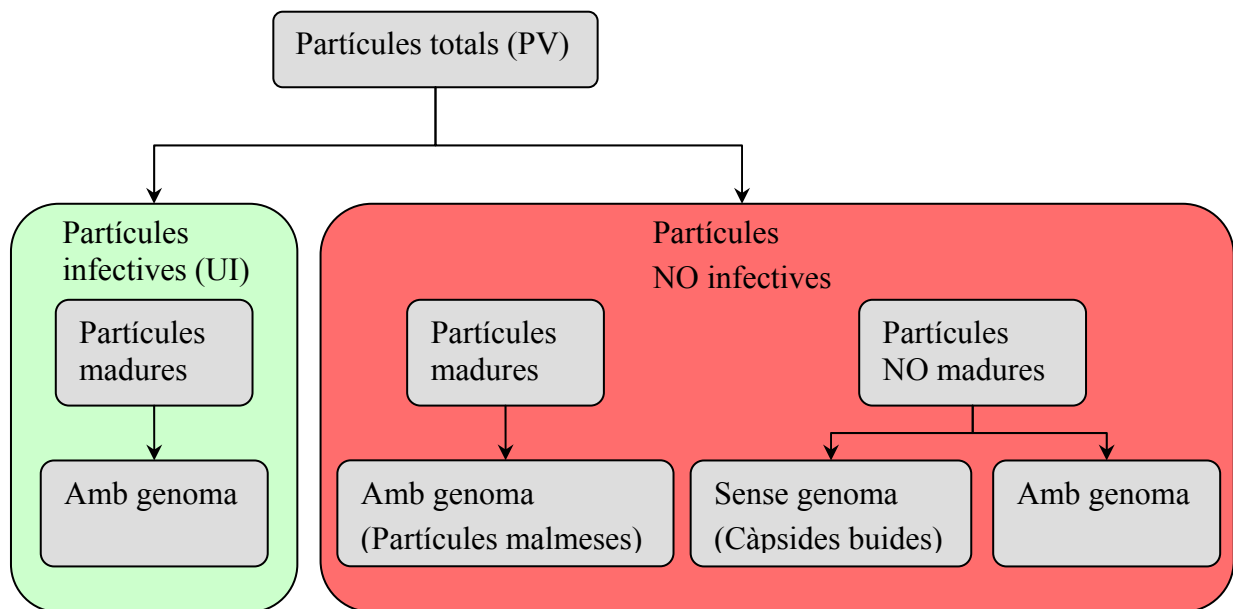


Figura 6.40. Representació esquemàtica de la distribució de partícules víriques que componen una mostra procedent de l'estratègia de purificació escalable.

Pel que fa a la seva quantificació, mentre que les partícules infectives amb genoma (UI) són relativament fàcils de quantificar mitjançant assajos d'infectivitat per detectar l'efecte citopàtic del virus sobre un cultiu cel·lular en placa (per exemple, $DICT_{50}$); aquelles no infectives són encara difícilment quantificables. Només per a la determinació de les càpsides

buides tot just s'estan desenvolupant mètodes basats en l'estudi del precursor a la proteïna VIII (pVIII), una proteïna estabilitzadora de l'estructura de la càpside, com a marcador en experiments amb HPLC de fase reversa (RP-HPLC) o SDS-PAGE [19, 62]. La resta de partícules no disposa de cap mètode analític específicament dissenyat per a la seva quantificació.

Davant d'aquesta dificultat, es proposa emprar la microscòpia electrònica de transmissió per tractar de quantificar les partícules totals (PV). A més, en conjunció amb les anteriors anàlisis, proporcionarà una informació més completa sobre la caracterització de les mostres obtingudes.

6.7.2. Microscòpia electrònica de transmissió

La microscòpia electrònica de transmissió (TEM) és una potent tècnica, la qual permet observar de forma directa la morfologia dels virions i el seu estat. Aquesta possibilitat obre un ventall d'aplicacions molt ampli que van des del seguiment visual del progrés de la purificació fins al recompte de partícules víriques totals, tot diferenciant aquelles que no presenten genoma al seu interior.

Les mostres són fixades sobre una malla de coure i tenyides negativament amb àcid fosfotúngstic com a contrastant durant un o dos minuts, i posteriorment són examinades utilitzant el microscopi electrònic de transmissió JEM 1400 (JEOL) a diversos augments. Es capten fotografies de zones representatives de cada mostra.

6.7.2.1. Estratègia de purificació escalable

A la Figura 6.41 s'exposen fotografies a diferents augments de les diferents seccions de purificació inicial, intermèdia i final que conformen l'estratègia de purificació escalable per caracteritzar el progrés de la separació.

El material clarificat es capta a 60.000X i 150.000X a la Figura 6.41a i a la Figura 6.41b, respectivament. Es pot observar una quantitat significativa d'agregats proteics d'elevat pes molecular que trenquen la uniformitat del fons al voltant dels virions ben definits. Progressivament, després de cada etapa de separació, el fons de les fotografies esdevé més homogeni, indicant l'eliminació efectiva dels contaminants fins arribar a la Figura 6.41e i a la Figura 6.41f, on es mostra la fracció de virus pur obtinguda en finalitzar el procés de polit. En concret a la Figura 6.41f, amb un augment de 150.000X, es revela la geometria icosaèdrica de les càpsides. Els virions es mostren uniformement distribuïts sobre la superfície de la malla, i es distingeixen clarament dos tipus de partícules, com era d'esperar.

D'una banda, els virus que, al menys aparentment, han completat el seu procés de maduració, disposen d'una càpside compacta amb genoma al seu interior que exclou qualsevol traça de contrastant (color més clar sobre el fons més obscur). Aquests virions, en principi, són infectius si no tenen malmès cap element de la seva estructura, com per exemple les fibres. D'altra banda, existeixen aquelles partícules que es fotografien amb l'interior obscur limitat pel contorn de la càpside, la qual mostra algun defecte i és permeable al contrastant.

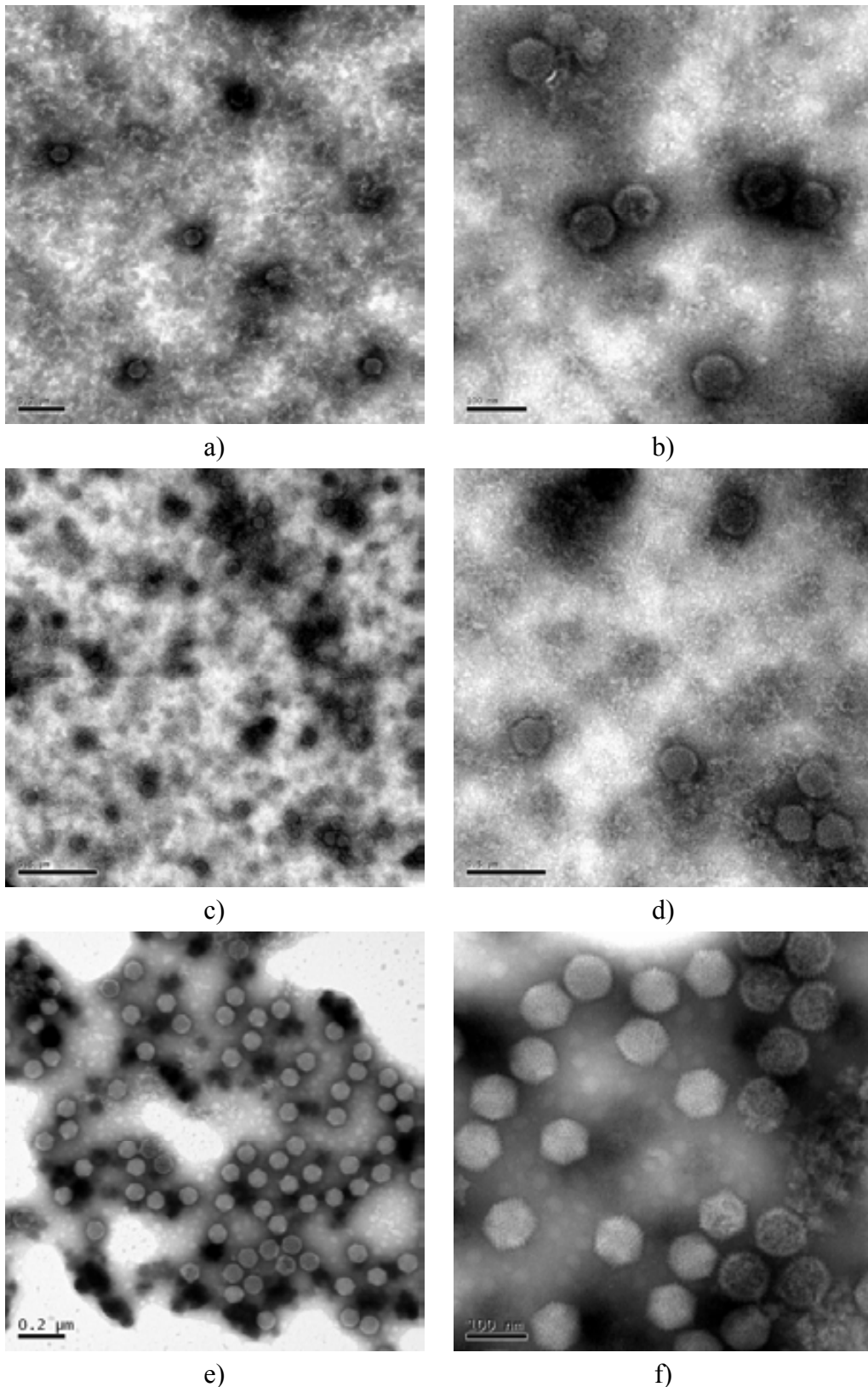


Figura 6.41. Fotografies de microscopi electrònic de transmissió de partícules víriques tenyides negativament amb àcid fosfotúngstic durant l'estratègia de purificació escalable. Seguiment de l'eliminació d'agregats proteics contaminants. a) Clarificat 60.000X; b) Clarificat 150.000X; c) Retingut diafiltrat 40.000X; d) Retingut diafiltrat 150.000X; e) Pic de virus pur (Polit) 60.000X; f) Pic de virus pur (Polit) 150.000X. El fons de les fotografies esdevé més homogeni com menys proteïnes contaminants hi ha a la mostra. El diàmetres de les càpsides oscil·la entre 75 nm i 100 nm.

Aquestes últimes no presenten genoma al seu interior, han estat descrites prèviament com a partícules buides o incomplertes [17, 63], i es fotografien amb la càpside més arrodonida, probablement per la pèrdua de les capsòmers-penton que defineixen els vèrtex [19].

Les càpsides buides constitueixen formes no infectives del vector adenoviral. No obstant, contribueixen a la quantitat de partícules físiques totals i a la resposta immunològica que pugui desenvolupar l'organisme al qual s'injecten. La seva presència en la mostra final indica la incapacitat de les etapes cromatogràfiques per eliminar-les. Aquestes elueixen amb un temps de retenció idèntic a aquell dels virions madurs, doncs, la càpside, on resideixen les propietats explotades per la cromatografia, és essencialment idèntica disposi o no de genoma [19].

A partir de les fotografies realitzades, també és possible extreure una relació aproximada entre les partícules amb genoma i les càpsides buides, encara que des d'un punt de vista de caracterització de la mostra final obtinguda té molt més sentit determinar el nombre de partícules víriques totals (PV).

Aquesta quantificació es realitza mitjançant el recompte visual dels virions en suspensió presents en una mescla homogènia (veure Figura 6.42), on hi ha present una solució d'esferes de làtex de 100 nm de diàmetre, la qual té una concentració perfectament coneguda (veure apartat 9.7.2.2 del capítol de materials i mètodes).

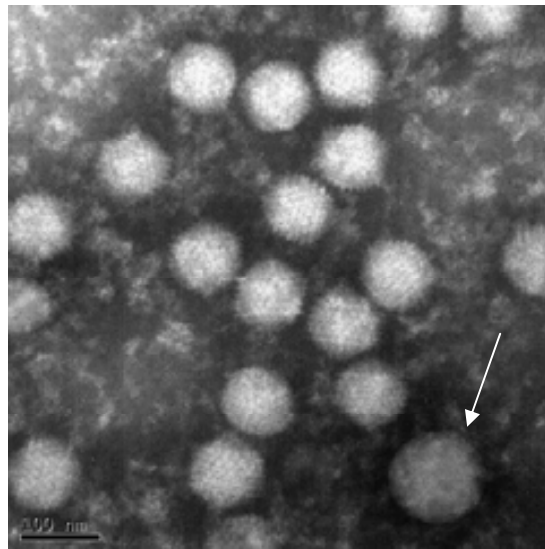


Figura 6.42. Fotografia de microscopi electrònic de transmissió. Determinació de les partícules víriques totals tenyides negativament amb àcid fosfotúngstic durant l'estratègia de purificació escalable. La sageta indica una esfera de làtex de 100 nm de diàmetre, la resta són virions.

La concentració de partícules víriques totals en el producte final s'utilitza habitualment per definir la dosi clínica a administrar [27]. En l'estratègia de purificació escalable és de $1,07 \cdot 10^{12}$ PV/mL.

Aquest paràmetre permet el càlcul de la relació de partícules víriques totals respecte partícules

madures infectives (PV:UI), la qual s'utilitza en el control de qualitat del vector adenoviral, com a indicador de la potència del producte [64]. Pot variar àmpliament dins d'un mateix procés i, fins i tot, en diferents preparacions per al microscopi electrònic d'una mateixa etapa, degut a la variabilitat en la disposició de les partícules. Per aquesta raó és necessària la presa d'un nombre elevat de fotografies per realitzar el recompte.

Com s'ha comentat anteriorment, per evitar problemes derivats d'una excessiva resposta immunològica, les agències reguladores com la FDA recomanen, com a màxim, una relació PV:UI de 30:1 [39]. Tenint en compte el valor abans calculat i el títol infectiu de l'etapa de Polit procedent de la Taula 6.25 ($1,98 \cdot 10^{11}$ UI/mL), la relació és de $6(\pm 4):1$, la qual es troba significativament per sota de la dada aconsellada per la FDA. En la bibliografia existeix un ampli ventall de valors publicats, el qual depèn molt de les característiques pròpies de cadascun dels diferents processos avaluats.

6.7.2.2. Estratègia de purificació no escalable

Les captures de microscòpia electrònica de transmissió per a la preparació final de l'estratègia de purificació no escalable es mostren a la Figura 6.43.

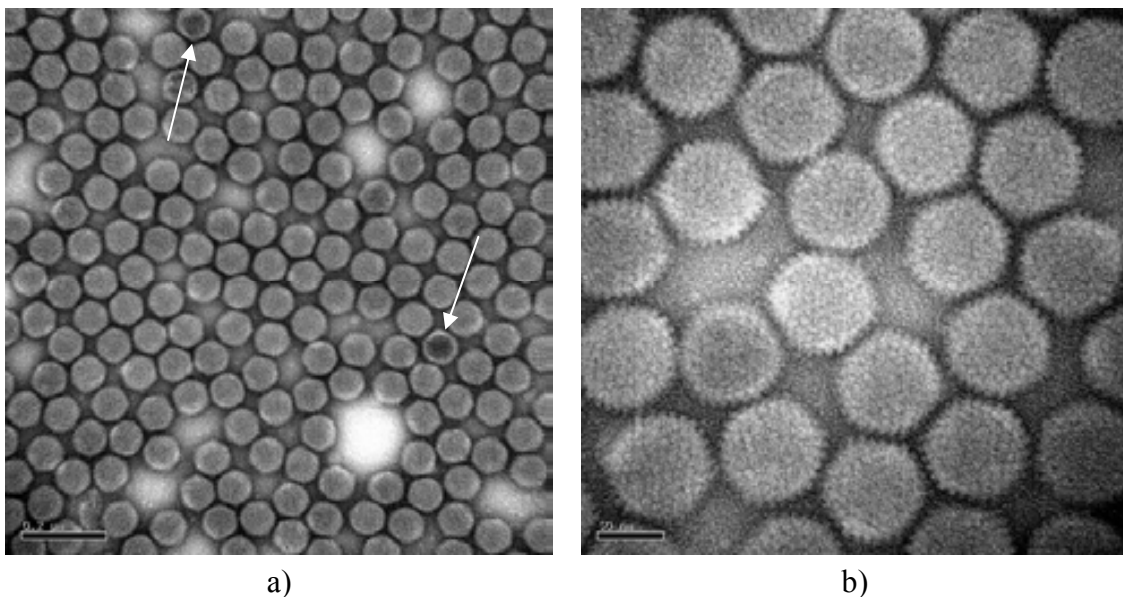


Figura 6.43. Fotografies de microscopi electrònic de transmissió de partícules víriques tenyides negativament amb àcid fosfotúngstic durant l'estratègia de purificació no escalable. a) Virus pur 80.000X; b) Virus 250.000X. El diàmetre de les càpsides oscil·la entre 75 nm i 100 nm. Les sagetes indiquen dues càpsides buides.

Destaca la puresa i l'alta concentració de virions, disposant-se en forma de “mosaic” a sobre de la malla. Tanmateix, el fet més remarcable de la Figura 6.43 es basa en la presència d'un ínfim nombre de càpsides buides, pràcticament menyspreable, però existent. Aquesta disminució tan espectacular respecte la mostra de l'estratègia escalable es deu a la recollida específica de la banda amb una densitat específica de 1,34 g/mL, en finalitzar la segona ronda d'ultracentrifugació. Tot i això, la presència de càpsides buides indica que la distribució de partícules víriques que es posa de manifest a la Figura 6.40 continua complint-se en el cas de l'estratègia de purificació no escalable.

En aquest cas, la concentració de partícules víriques totals determinada per TEM amb esferes de làtex proporciona un valor de $2,68 \cdot 10^{12}$ PV/mL.

Arribats a aquest punt, és necessari fer un incís. Aprofitant la pràctica totalitat de partícules amb genoma en la preparació, ja siguin infectives o no, existeix un altre mètode de quantificació de partícules víriques totals que, degut a la seva senzillesa, es troba àmpliament estès. Aquest és un mètode espectrofotomètric (veure apartat 9.7.2.3 del capítol de materials i mètodes) desenvolupat per Maizel i col., el qual mesura el DNA adenoviral alliberat a 260 nm [65]. Presenta un error d'un 10%, però es veu afectat molt negativament per la presència d'impureses en la mostra; d'altra banda, no quantifica les partícules sense genoma, molt importants en la mostra final de l'estratègia de purificació escalable. Per tant, el seu ús es troba restringit a preparacions altament pures com les obtingudes mitjançant la ultracentrifugació.

La concentració de partícules físiques totals avaluades a partir del mètode espectrofotomètric és de $2,72 \cdot 10^{12}$ PV/mL, molt similar al determinat per microscòpia, només 1,5% superior.

Tenint en compte el valor mitjà de les concentracions físiques obtingudes i el títol infectiu de l'etapa de polit procedent de la Taula 6.3 ($4,64 \cdot 10^{11}$ UI/mL), la relació PV:UI també resulta de $6(\pm 2):1$; la relació típica publicada en processos basats en ultracentrifugació és menor de 50:1 [34]. En comparació amb l'estratègia de purificació escalable, existeix aproximadament la mateixa relació PV:UI. Considerant, però, que en l'estratègia no escalable existeix una fracció molt menor de càpsides buides respecte la fracció present en l'estratègia escalable, aquest fet pot indicar que la ultracentrifugació resulta una operació molt més "agressiva" per al virió. De fet, el menor rendiment global de purificació en l'estratègia no escalable (12,1%) respecte l'escalable (40,3%) ja pot suggerir aquesta conclusió.

Una vegada realitzat el desenvolupament de l'etapa de purificació, la qual ha deixat palesos els avantatges i inconvenients de les diferents estratègies de purificació, es considera que es disposa d'un grau de definició del bioprocés prou elevat, com per analitzar la possible implantació en el següent capítol del present treball.

6.8. Bibliografia

1. Curiel, D. and Douglas, J.T. 2002. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*. 1st ed. San Diego (CA): Academic Press. 677 p.
2. Rexroad, J., Wiethoff, C.M., Green, A.P., Kierstead, T.D., Scott, M.O. and Middaugh, C.R. 2003. *Structural stability of adenovirus type 5*. Journal of pharmaceutical sciences 92(3): 665-678.
3. Hoganson, D.K., Ma, J.C., Asato, L., Ong, M., Printz, M.A., Huyghe, B.G., Sosnowski, B.A. and D'andrea, M.J. 2002. *Development of a stable adenoviral vector formulation*. Bioprocessing Journal 1(1): 43-48.
4. Shih, S., McGlennon, K.R. and Moody, D. 2001. *Adenovirus formulations for gene therapy*. European Patent EP1109896.
5. Philipson, L. 1984. *Structure and assembly of adenoviruses*. Current topics in microbiology and immunology 109: 1.
6. Oliver, C.J., Shortridge, K.F. and Belyavin, G. 1976. *Diffusion coefficient and molecular weight of type 5 adenovirus by photon-correlation spectroscopy*. Biochimica et biophysica acta 437(2): 589-598.
7. Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D. and Aguilar-Cordova, E. 1997. *Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination*. Nature medicine 3(7): 808-811.
8. Konz, J.O., Livingood, R.C., Bett, A.J., Goerke, A.R., Laska, M.E. and Sagar, S.L. 2005. *Serotype specificity of adenovirus purification using anion-exchange chromatography*. Human Gene Therapy 16(11): 1346-1353.
9. Konz, J.O., Lee, A.L., Lewis, J.A. and Sagar, S.L. 2005. *Development of a purification process for adenovirus: controlling virus aggregation to improve the clearance of host cell DNA*. Biotechnology progress 21(2): 466-472.
10. Ozturk, S.S. and Hu, W.S. 2005. *Cell Culture Technology For Pharmaceutical And Cell-based Therapies*: Taylor & Francis Group p.
11. Green, M. and Piña, M. 1963. *Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus*. Virology 20: 199-207.
12. Altaras, N.E., Aunins, J.G., Evans, R.K., Kamen, A., Konz, J.O. and Wolf, J.J. 2005. *Production and formulation of adenovirus vectors*. Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260.
13. Henry, O., Dormond, E., Perrier, M. and Kamen, A. 2004. *Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures*. Biotechnology and bioengineering 86(7): 765-774.
14. Murphy, C., Nahapetian, A., Iyer, P., Gore, N., Fogle, P., Moreland, T. and Wilhelm, E., in *Viral Vectors and Vaccines*, T.W.B. Foundation, Editor. 1998: Williamsburg, VA.

15. Burova, E. and Ioffe, E. 2005. *Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications*. Gene Therapy 12: S5-S17.
16. Maizel, J.V., White, D.O. and Scharff, M.D. 1968. *The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion*. Virology 36(1): 126-136.
17. Prage, L., Höglund, S. and Philipson, L. 1972. *Structural proteins of adenoviruses. VIII. Characterization of incomplete particles of adenovirus type 3*. Virology 49(3): 745-757.
18. Burlingham, B.T., Brown, D.T. and Doerfler, W. 1974. *Incomplete particles of adenovirus. I. Characteristics of the DNA associated with incomplete adenovirions of types 2 and 12*. Virology 60(2): 419-430.
19. Vellekamp, G., Porter, F.W., Sutjipto, S., Cutler, C., Bondoc, L., Liu, Y.H., Wylie, D., Cannon-Carlson, S., Tang, J.T. and Frei, A. 2001. *Empty Capsids in Column-Purified Recombinant Adenovirus Preparations*. Human Gene Therapy 12(15): 1923-1936.
20. Ishibashi, M. and Maizel, J.V. 1974. *The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediate between top components and aged virions*. Virology 57(2): 409-424.
21. Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., Carey, K.D., Finegold, M. and Ng, P. 2004. *Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates*. Human Gene Therapy 15(1): 35-46.
22. Moncany, M.L., Revet, B. and Girard, M. 1980. *Characterization of a new adenovirus type 5 assembly intermediate*. Journal of General Virology 50(1): 33-47.
23. Biosciences, A. 2000. *Sephadex G-25 media and pre-packed columns: Data file*. GE Healthcare.
24. Morenweiser, R. 2005. *Downstream processing of viral vectors and vaccines*. Gene therapy 12 Suppl 1: S103-110.
25. Arcand, N., Bernier, A., Transfiguracion, J., Jacob, D., Coelho, H. and Kamen, A. 2003. *Adenovirus type 5 (Ad5) chromatographic purification process at 20L scale*. Bioprocessing Journal 2: 72-75.
26. Kamen, A. and Henry, O. 2004. *Development and optimization of an adenovirus production process*. The Journal of Gene Medicine 6 Suppl 1: S184-192.
27. Lusky, M. 2005. *Good Manufacturing Practice Production of Adenoviral Vectors for Clinical Trials*. Human Gene Therapy 16(3): 281-291.
28. Huyghe, B.G., Liu, X., Sutjipto, S., Sugarman, B.J., Horn, M.T., Shepard, H.M., Scandella, C.J. and Shabram, P. 1995. *Purification of a Type 5 Recombinant Adenovirus Encoding Human p53 by Column Chromatography*. Human Gene Therapy 6(11): 1403-1416.

29. Blanche, F., Cameron, B., Barbot, A., Ferrero, L., Guillemin, T., Guyot, S., Somarriba, S. and Bisch, D. 2000. *An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles*. *Gene Therapy* 7: 1055-1062.
30. Segura, M.M., Alba, R., Bosch, A. and Chillón, M. 2008. *Advances in Helper-Dependent Adenoviral Vector Research*. *Current Gene Therapy* 8(4): 222-235.
31. Ballew, H.W., Jesus Martinez, F., Markee, C. and Eddleman, R.T. 2002. *The abc's of filtration and bioprocessing for the third millenium*. 1st ed. Los Angeles (CA): Spectrum Laboratories, Inc. 155 p.
32. Biosciences, A. 2005. *Selection Handbook: Hollow fiber cartridges and systems for membrane separations*: GE Healthcare p.
33. Segura, M.M., Kamen, A., Trudel, P. and Garnier, A. 2005. *A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography*. *Biotechnology and bioengineering* 90(4): 391-404.
34. Green, A.P., Huang, J.J., Scott, M.O., Kierstead, T.D., Beaupre, I., Gao, G.P. and Wilson, J.M. 2002. *A New Scalable Method for the Purification of Recombinant Adenovirus Vectors*. *Human Gene Therapy* 13(16): 1921-1934.
35. Biosciences, A. 2006. *MidJet benchtop system: Instructions for use*. 1st ed. Uppsala: GE Healthcare. 21 p.
36. Biosciences, A. 2006. *QuixStand benchtop system: User manual*. 1st ed. Uppsala: GE Healthcare. 46 p.
37. Goerke, A.R., To, B.C.S., Lee, A.L., Sagar, S.L. and Konz, J.O. 2005. *Development of a Novel Adenovirus Purification Process Utilizing Selective Precipitation of Cellular DNA*. *Biotechnology and bioengineering* 91(1): 12-21.
38. Murphy, D.B. and Epstein, S.L. 1998. *Guidance for industry: Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy*. *Human Gene Therapy* 12: 304-314.
39. Bauer, S.R., Pilaro, A.M. and Weiss, K.D. 2002. *Testing of adenoviral vector gene transfer products: FDA expectations*, in *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*, D.T. Curiel and J.T. Douglas, Editors. 615-654.
40. Eaves, G.N. and Jeffries, C.D. 1963. *Isolation and properties of an exocellular nuclease of Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 85(2): 273-278.
41. Nestle, M. and Roberts, W.K. 1969. *An extracellular nuclease from Serratia marcescens I. Purification and some properties of the enzyme*. *Journal of Biological Chemistry* 244(19): 5213-5218.
42. Miller, M.D., Tanner, J., Alpaugh, M., Benedik, M.J. and Krause, K.L. 1994. *A structure of Serratia endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA*. *Nature Structural Biology* 1(7): 461-468.
43. Ball, T.K., Saurugger, P.N. and Benedik, M.J. 1987. *The extracellular nuclease gene of Serratia marcescens and its secretion from Escherichia coli*. *Gene* 57(2): 183-192.

44. Biosciences, A. 2004. *Simplify your purification procedures...cut out those manual steps*. 1st ed. Uppsala: Amersham Biosciences AB. 17 p.
45. Cheryan, M. 1986. *Ultrafiltration Handbook*, Technomic Pub. Co. Inc., Lancaster, Pennsylvania.
46. Waters. *SPE Method Development*. [Cited 2010]. Available from: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=it_IT&cid=10083845.
47. Chemicals, P.F. 2004. *Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods*: GE Healthcare Bio-Sciences AB p.
48. Jacob, L. and Chao, T. 2002. *Ion exchange media for biochromatography*. Euro-biotech.
49. BioProcess, G.H.B. 2006. *Capto Q - Capto ViralQ: Instructions*. GE Healthcare Bio-Sciences AB.
50. Processing, L.B. 2002. *Fractogel EMD: Process media*. Merck KGaA.
51. Nadeau, I. and Kamen, A. 2003. *Production of adenovirus vector for gene therapy*. *Biotechnology advances* 20(7-8): 475-489.
52. McCabe, W.L., Smith, J.C. and Harriott, P. 2004. *Unit operations of chemical engineering*. 7th ed. London: McGraw-Hill Science/Engineering/Math. 1152 p.
53. Peixoto, C., Ferreira, T.B., Carrondo, M.J.T., Cruz, P.E. and Alves, P.M. 2006. *Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography*. *Journal of virological methods* 132(1-2): 121-126.
54. Chemicals, P.F. 2006. *Gel Filtration: Principles and Methods*: GE Healthcare Bio-Sciences AB p.
55. Biosciences, A. 2005. *Sepharose 6 Fast Flow: Gel filtration media*. GE Healthcare.
56. Gekko, K. and Timasheff, S.N. 1981. *Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures*. *Biochemistry* 20(16): 4667-4676.
57. Gekko, K. and Timasheff, S.N. 1981. *Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol*. *Biochemistry* 20(16): 4677-4686.
58. Tanaka, N. and Kobayashi, H. 2003. *Monolithic columns for liquid chromatography*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 376(3): 298-301.
59. Whitfield, R.J., Batom, S.E., Barut, M., Gilham, D.E. and Ball, P.D. 2009. *Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of adenovirus type 5 particles with a prototype anion-exchange analytical monolith column*. *Journal of Chromatography A* 1216(13): 2725-2729.
60. Galdiero, F. 1979. *Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment*. *Archives of Virology* 59(1): 99-105.

61. Koolman, J. and Roehm, K.H. 2005. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed. Stuttgart / New York (NY): Thieme. 467 p.
62. Takahashi, E., Cohen, S.L., Tsai, P.K. and Sweeney, J.A. 2006. *Quantitation of adenovirus type 5 empty capsids*. *Analytical biochemistry* 349(2): 208-217.
63. Tóth, M., Taródi, B. and Béládi, I. 1982. *Preparative separation of intact incomplete and empty adenovirus type 2 particles*. *Acta virologica* 26(4): 217.
64. McIntyre, M. 2001. *Development of viral vectors for use in gene transfer trials; product characterization and quality concerns*.
65. Maizel, J.V., White, D.O. and Scharff, M.D. 1968. *The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12*. *Virology* 36(1): 115-125.

7. ANÀLISI DE PROCÉS

7. ANÀLISI DE PROCÉS

Al llarg dels capítols previs, l'estudi del bioprocés d'obtenció de vectors adenovirals ha contribuït a disposar d'un conjunt molt considerable de dades. Es considera que aquesta informació ja proporciona una bona base inicial com per poder traslladar-la a l'avaluació d'una o diverses alternatives de bioprocés a escala productiva, en les quals no només s'analitzi exhaustivament la seva viabilitat tècnica, sinó on també es considerin aspectes igualment importants com són els econòmics, derivats de la possible implantació real.

Per tant, l'objectiu del present capítol és el plantejament i el disseny de diferents models del bioprocés a escala industrial, a partir de les dades empíriques obtingudes prèviament, per tal que una anàlisi posterior permeti la selecció definitiva de l'opció més rendible per ésser portada a la pràctica.

Per assolir aquest objectiu, es fa molt aconsellable l'aprofitament de la potència i rapidesa de càlcul dels simuladors de processos, els quals es troben específicament concebuts per facilitar la transició des de les etapes de desenvolupament i de disseny del bioprocés fins a la seva implantació final a escala industrial. En conseqüència, s'utilitzen per resoldre tot un seguit de tasques essencials per a la definició del projecte. Entre d'altres, destaquen la resolució dels balanços de matèria i energia, l'estimació de les dimensions de les unitats de procés, així com de la programació temporal de cada lot o la realització de l'anàlisi econòmica [1].

Actualment, existeix un ampli ventall de simuladors a l'abast, gran part originalment dissenyats per al tractament de processos químics: Aspen Plus i Aspen HYSYS (ambdós de AspenTech Inc.), Chemcad (Chemstations, Inc.), PRO/II (Invensys Inc.), etc... D'entre aquests, s'opta pel SuperPro Designer (Intelligen Inc.) degut a la seva senzillesa d'ús i versatilitat a l'hora de tractar tant casos procedents de la indústria química com de la biotecnològica.

7.1. Bases de disseny

Les bases de disseny s'estableixen com a punt de partida per tal de desenvolupar els models o simulacions de les alternatives de procés generades. La quantitat de producte anual a obtenir és el paràmetre fonamental que les defineix.

En el cas de la teràpia gènica, existeixen dues variables fonamentals que fixen aquesta quantitat: la dosi de vectors adenovirals i la quantitat anual de pacients a tractar. Mentre la primera depèn de l'activitat específica del producte, de la malaltia en qüestió i del tractament a seguir; la segona es determina en base a estudis de mercat i fixant una quota objectiu dins d'aquest. La manca de dades en aquest sentit obliga a emprar informació procedent de productes similars que es trobin prèviament disponibles. Com es comenta en la introducció, la Gendicina és l'únic biofàrmac destinat a teràpia gènica i basat en l'administració de vectors adenovirals, actualment comercialitzat en el mercat xinès i en avançada fase d'aprovació en la Índia. En base a les perspectives de producció anunciades per fer front a la fase III de les proves clíniques d'aquest medicament, s'estableix una dosi de $1 \cdot 10^{12}$ partícules víriques (PV) administrada setmanalment durant 8 setmanes per fer front a 125.000 pacients per any [2]. Per tant, la capacitat de la planta es determina en $1 \cdot 10^{18}$ partícules víriques purificades per any.

D'altra banda, un segon paràmetre addicional per establir les bases de disseny és el temps d'operació de la planta. Aquesta última es dissenya per mantenir-se en funcionament durant 330 dies per any.

Finalment, cal esmentar que el criteri de dimensionament de tots els equips dissenyats es basa en suposar que les productivitats obtingudes durant el desenvolupament es mantindran constants, independentment de l'escala del procés. Aquesta primera aproximació permet continuar endavant amb el treball, davant la manca d'estudis a nivell pilot per analitzar possibles limitacions derivades del canvi d'escala.

7.2. Descripció del bioprocés

Al llarg d'aquest treball, es proposen quatre propostes finals a analitzar: d'una banda, el bioprocés convencional operant en discontinu i en continu amb perfusió i de l'altra, el bioprocés no convencional operant en discontinu i en continu amb perfusió.

Aquestes alternatives es diferencien, bàsicament, pel sistema de producció (bioreactor) emprat i per la seva estratègia de producció. No cal recordar la importància cabdal que té el bioreactor sobre tot el procés: el seu correcte dimensionament, arrel tant de les dades cinètiques del biocatalitzador com de la productivitat específica cel·lular, no només representa resoldre satisfactòriament la peça clau de l'etapa de producció del procés, sinó que també afecta les mides dels equips principals de purificació (columnes de cromatografia), així com les de les unitats auxiliars de la planta, com poden ser tancs d'emmagatzematge, bombes, compressors, etc...

D'aquesta manera, el bioprocés convencional es basa en el tradicional reactor de tanc agitat construït amb materials totalment reutilitzables després de diversos cicles de neteja i esterilització. En canvi, el bioprocés no convencional es fonamenta en el reactor amb una cambra de cultiu construïda amb material plàstic rebutjable i disponible per ésser emprada de forma immediata. Per tal d'explotar correctament tots els avantatges que pot aportar la tecnologia d'un sol ús, no és aconsellable restringir-la només dins de l'àmbit de la unitat principal de bioreacció, sinó que també cal fer-la extensible a la resta del procés, en la mesura del possible. Aquest fet es tradueix en forma d'unitats, específicament dissenyades, com per exemple els contenidors de plàstic rebutjable.

Pel que fa a la purificació, el criteri fonamental és la possibilitat d'implantació a escala industrial. De les dues possibilitats avaluades al capítol corresponent, l'única capaç de complir-lo és la basada en l'estratègia de purificació escalable. De manera que en aquest aspecte, no es dona cap diferència conceptual entre les alternatives proposades.

7.2.1. Bioprocés convencional

7.2.1.1. Estratègia en discontinu

Per facilitar la seva descripció, el diagrama de bioprocés que descriu la totalitat d'aquesta alternativa es divideix en l'etapa de producció (veure Figura 7.1) i la de purificació (veure Figura 7.2).

En l'etapa de producció es distingeixen dues seccions: la primera, situada a la part superior de la Figura 7.1, té com a objectiu la preparació de l'inòcul cel·lular necessari per iniciar la segona secció de bioreacció principal i obtenció de vectors adenovirals.

La primera secció requereix dues fases de canvi d'escala per obtenir l'inòcul necessari. La fase inicial comença a partir dels dos bioreactors de sembra de 100 L de capacitat P-1/V-101. Per evitar haver de disposar d'unitats de menor volum, aquests bioreactors s'inoculen amb un volum operacional de 20 L; el volum definitiu és assolit gràcies a l'addició de medi lliure de sèrum prèviament adquirit des del tanc P-4/V-107, després de superar la filtració redundant de 0,2 µm P-3/DE-101 per assegurar-ne l'esterilitat. La segona fase es constitueix de manera anàloga a l'anterior, el següent bioreactor de sembra de 1.000 L de capacitat P-20/V-102, també per duplicat, rep el contingut dels anteriors i l'entrada de medi fresc del tanc P-21/V-103, via filtració esterilitzant de la unitat P-2/DE-104.

La concentració cel·lular acumulada fins al moment permet continuar amb la segona secció, la qual alberga els dos bioreactors principals de 8.000 L de volum P-15/V-104. Aquest volum, tot i que considerable, és raonable tenint en compte unitats similars que s'estan desenvolupant per a la producció de vacunes adenovirals emprant el virus VIH [3]. L'addició de medi des del tanc P-11/V-108, a través del filtre esterilitzant P-10/DE-102, permet l'inici de la fase de creixement del cultiu amb una concentració cel·lular de $1,5 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual evoluciona durant quatre dies fins assolir $10 \cdot 10^5$ cell/mL. En aquest instant, s'inicia la infecció amb una MOI de 5 UI/cell i una addició de medi lliure de sèrum, procedent del circuit format pel tanc

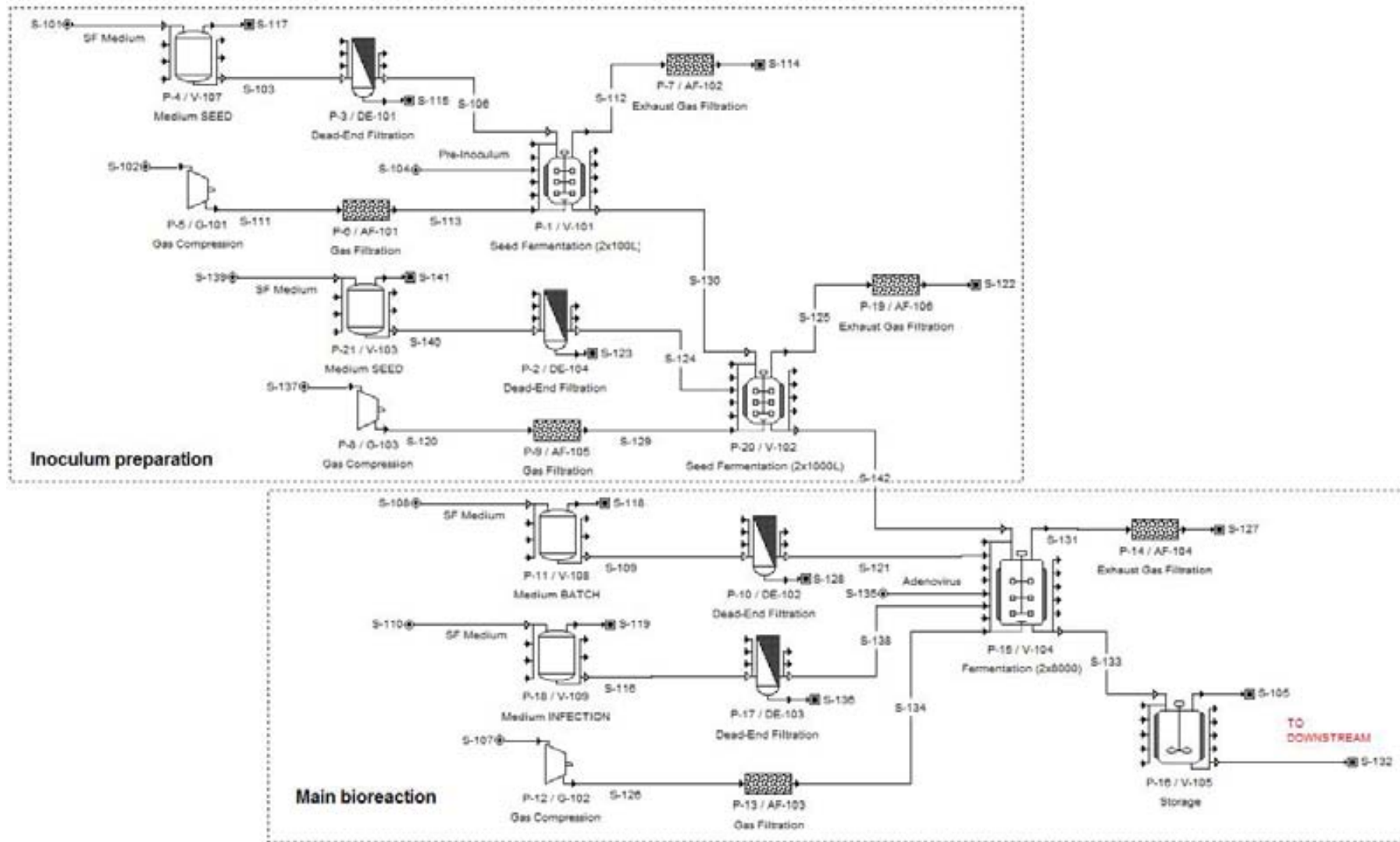


Figura 7.1. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de producció de vectors adenovirals basat en l'alternativa convencional, estratègia en discontinu, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.). El diagrama consta de dues seccions: a la part superior se situa la zona de preparació d'inòcul i a la part inferior la zona de bioreacció principal.

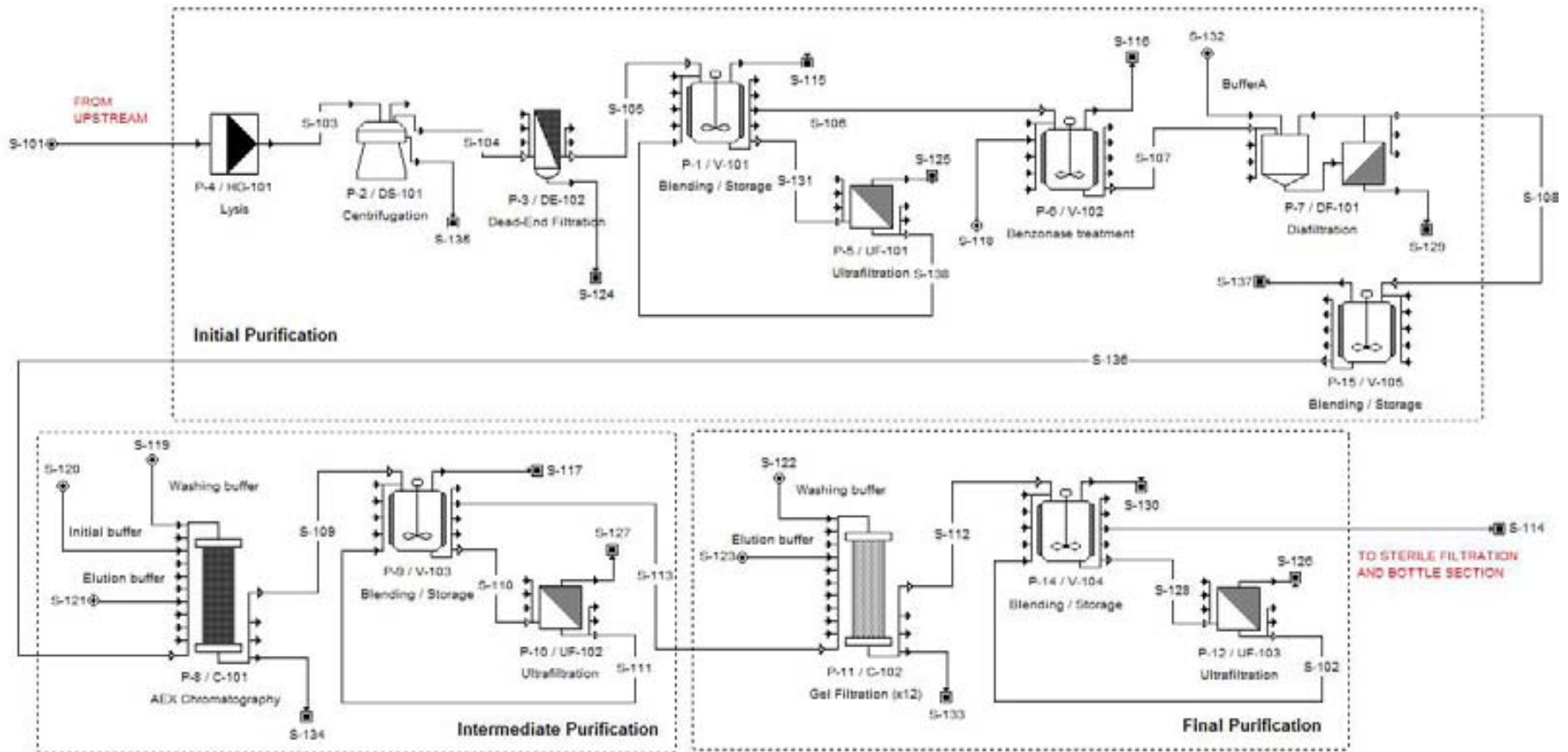


Figura 7.2. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de purificació de vectors adenovirals basat en l'alternativa convencional, estratègia en discontinu, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.).

P-18/V-109 i el filtre P-17/DE-103, equivalent al 10% del volum total del bioreactor. El temps de recollida és de 48 h postinfecció, amb un títol víric final de $1,3 \cdot 10^9$ UI/mL. Les condicions de cultiu en tots els bioreactors, al llarg del creixement cel·lular i la infecció són les desenvolupades a l'apartat 5.4.2 del capítol de producció. Amb l'objectiu de mantenir la independència entre l'etapa de producció i la de purificació, davant la possibilitat d'alguns contratemps, és necessària la presència del tanc d'emmagatzematge P-16/V-105, on es transfereix la totalitat del contingut del bioreactor principal (15.200 L).

El diagrama de bioprocés que mostra l'etapa de purificació (veure Figura 7.2) es troba organitzat segons les tres seccions descrites en el capítol de purificació: purificació inicial, purificació intermèdia i purificació final.

A la secció de purificació inicial es tracta el contingut del tanc P-16/V-105, procedent de l'etapa de producció. Com a primera operació, es procedeix a la lisi cel·lular per assegurar l'alliberament del producte d'interès, gràcies a la circulació del brou de cultiu a través del microfluiditzador P-4/HG-101. A continuació, s'executen les operacions de separació menys específiques que conformen el procés de clarificació; així, el sobrenedant de la complexa mescla lisada es recull per centrifugació contínua (P-2/DS-101), i es microfiltra amb un diàmetre de porus de $0,6 \mu\text{m}$ (P-3/DE-102). Posteriorment, aquest fluid lliure de restes cel·lulars macroscòpiques es transfereix al tanc d'emmagatzematge P-1/V-101, el qual serveix d'aliment a l'etapa d'ultrafiltració P-5/UF-101, on es concentra 10 vegades el brou de cultiu mitjançant una membrana de 100 kDa. El contingut d'àcids nucleics és dràsticament reduït en un 93,4% amb les operacions de tractament amb benzonasa (100 UA/mL) a l'interior del tanc P-6/V-102 i en la unitat de diafiltració P-7/DF-101. El volum resultant d'aquesta secció (1.520 L) s'emmagatzema al tanc pulmó P-15/V-105, a l'espera d'iniciar-ne la següent etapa.

La secció de purificació intermèdia contempla l'operació de cromatografia de bescanvi aniònic, tot emprant la columna P-8/C-101, amb l'objectiu de capturar específicament els virions. L'esmentada columna presenta un volum de 113 L, les dimensions de la qual (diàmetre de 0,6 m i alçada de 0,4 m) es troben d'acord amb les dades publicades per la patent de Tang i col. [4]; al seu interior es troba reblerta la reina Fractogel DEAE EMD (M). Cada cicle d'operació es realitza segons les condicions descrites a l'apartat 6.5.7 del capítol de purificació. El volum eluït de 7.500 L s'emmagatzema al tanc P-9/V-103 per, posteriorment, iniciar la segona etapa de concentració per ultrafiltració emprant la unitat P-10/UF-102. En aquesta s'assoleix una reducció de volum en el retingut respecte l'aliment inicial de 50 vegades.

Finalment, a la secció de purificació final es realitza el polit del procés amb l'eliminació d'aquelles impureses més similars al producte, mitjançant la cromatografia d'exclusió molecular. Aquesta operació es porta a terme a la columna de 100 L de volum total P-11/C-102, les dimensions de la qual (diàmetre de 0,4 m i alçada de 0,8 m) també obeeixen les dades publicades per la patent de Tang i col. [4]. La reina emprada per a tal propòsit és la Sepharose 6 Fast Flow. El nombre d'unitats utilitzades en paral·lel és de 12, la qual cosa permet carregar

en cadascuna un 12% del seu volum i fer front a la totalitat d'aliment a tractar. Una etapa final de concentració 10 vegades per ultrafiltració (P-12/UF-103) permet ajustar el volum definitiu i transferir els vectors adenovirals purs cap a la zona de filtració esterilitzant i d'envasat en vials de 1 mL.

A banda del disseny integral del bioprocés, de la resolució dels balanços de matèria i energia, així com del dimensionament dels equips, els resultats de la simulació també permeten analitzar la programació temporal de cada lot, gràcies a la representació del grau d'utilització de les diferents unitats vers el temps, tal i com es pot observar al digrama de Gantt de la Figura 7.3.

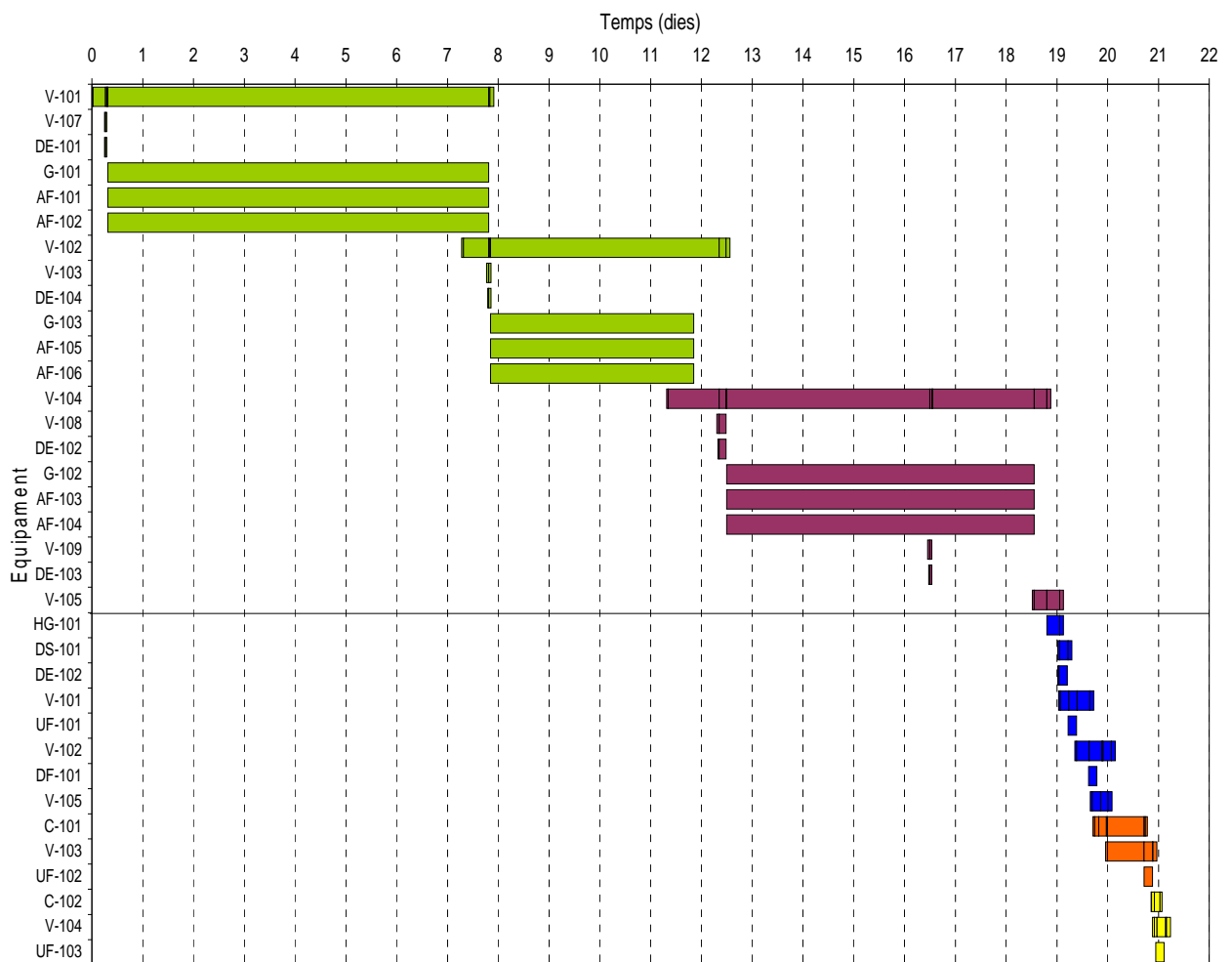


Figura 7.3. Diagrama de Gantt d'utilització d'equips emprant el bioprocés basat en l'alternativa convencional, estratègia en discontinu: secció de preparació de l'inòcul (■), secció de bioreacció principal (■), secció de purificació inicial (■), secció de purificació intermèdia (■) i secció de purificació final (■).

Cadascun dels equips, els quals integren les diverses seccions de les etapes de producció i purificació descrites en els diagrames de bioprocés anteriors (veure Figura 7.1 i Figura 7.2), presenta el seu període d'utilització dividit per línies verticals, d'acord amb les operacions (per exemple: càrrega, fermentació, descàrrega, CIP, SIP, etc...) que hi tenen lloc de forma

progressiva. Per facilitar la comprensió del diagrama anterior, es prescindeix de les unitats auxiliars de neteja (CIP SKIDS), les quals esdevenen els únics equips compartits de tot el procés, però que sí s'inclouen en la posterior anàlisi econòmica.

Com es pot observar, sempre que sigui possible, cal sincronitzar diferents operacions i executar-les al mateix temps en diferents equips, a mesura que el procés avanci. Aplicar aquest tipus de programació seqüencial, sempre que sigui possible, es tradueix no només en l'encavalcament temporal d'unitats en funcionament en un mateix lot, la qual cosa permet minimitzar el temps total del bioprocés, tot i la naturalesa discontinua del mateix; sinó que també desemboca en l'encavalcament dels diferents lots en realització, amb el consegüent augment de la capacitat productiva de la planta, tot incrementant el nombre màxim de lots per any que es poden realitzar, i, en conseqüència, reduint el volum necessari dels equips.

Aquest aspecte s'esquemmatitza a la Figura 7.4, on es mostra la programació temporal de tres lots consecutius del bioprocés. Aproximadament del dia 16 fins al dia 21 s'estan executant alhora, de manera que el dia 38 han finalitzat tots tres. Mentre que si la programació no fos seqüencial, en complir-se el dia 38, encara no hauria acabat el segon lot.

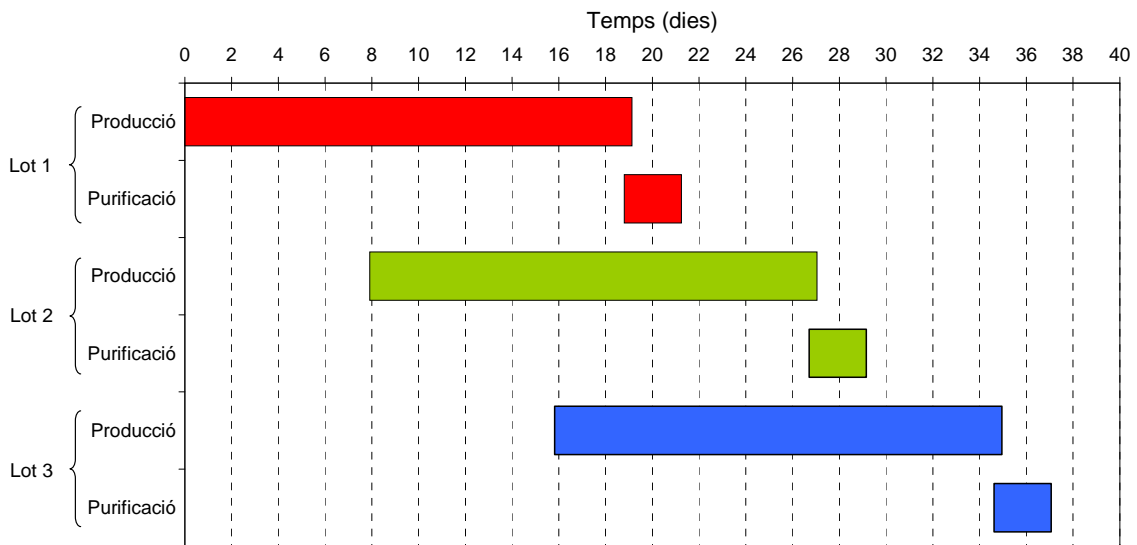


Figura 7.4. Diagrama de Gantt amb la programació temporal de tres lots del bioprocés basat en l'alternativa convencional.

Cal esmentar que aspectes organitzatius més complexes de les seqüències temporals de cada lot requeririen un treball molt més extens, a banda de programaris específics (com per exemple, el Schedule Pro (Intelligen Inc.)). La programació seqüencial ja proporciona, doncs, un bon punt de partida per comparar totes les alternatives avaluades.

De forma independent, l'etapa de producció, amb una durada total de 19,13 dies donada la lentitud del procés de creixement cel·lular dins del bioreactor, resulta aproximadament 8 vegades més llarga que la de purificació, la qual només requereix de 2,41 dies per completar-

se. La purificació cal que sigui el més ràpida possible per evitar la degradació del producte final.

Globalment, el temps del lot (*batch time*), des de l'inici de la producció fins al final de la purificació, resulta de 21,24 dies. Donat que no existeix cap equip que s'utilitzi contínuament durant tot el procés, el simulador indica que és possible reiniciar un nou lot cada 7,91 dies (*cycle time*). Aquest temps, el qual limita a 40 el nombre màxim de lots per any que es poden realitzar, coincideix amb el de la unitat més intensivament utilitzada. Per aquesta raó, aquest últim s'anomena unitat limitant o coll d'ampolla (*bottleneck equipment*) [5]. En la present alternativa, el coll d'ampolla són els dos bioreactors de sembra de 100 L de capacitat P-1/V-101, degut a l'estratègia d'escalat que hi té lloc, dissenyada per estalviar unitats de cultiu de menor volum.

La Taula 7.1 resumeix els principals paràmetres de la simulació, avaluats fins al moment i mostra com la capacitat productiva anual de la planta es troba sobredimensionada en aproximadament un 5% respecte les bases de disseny fixades a l'apartat 7.1 ($1 \cdot 10^{18}$ PV/any), la qual cosa li atorga un cert grau de flexibilitat per fer front a possibles imprevistos.

Paràmetres de la simulació		
Volum del bioreactor principal (L)		8.000 (2)
Volum de la columna AEXC (L)		113 (1)
Volum de la columna SEC (L)		100 (12)
Temps de producció (dies)		
		19,13
Temps de purificació (dies)		
		2,41
Temps total del lot (dies)		
		21,24
Temps reinici del lot (dies)		
		7,91
Nombre de lots/any		
		40
Capacitat màxima de la planta	(PV/lot)	$2,62 \cdot 10^{16}$
	(dosis/lot)	26.209
	(PV/any)	$1,05 \cdot 10^{18}$
	(dosis/any)	1.048.360

Taula 7.1. Resultats de simulació del bioprocés convencional, estratègia en discontinu. Entre parèntesi s'indica el nombre d'unitats de cada equip principal.

7.2.1.2. Estratègia en continu amb perfusió

El diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de producció d'aquesta estratègia (veure Figura 7.5) també disposa de dues seccions: la primera té com a objectiu la preparació de l'inòcul cel·lular per iniciar la segona secció de bioreacció principal i obtenció dels vectors.

A diferència de l'anterior alternativa, la secció de preparació de l'inòcul requereix només una única etapa de canvi d'escala, on se situa l'únic bioreactor de sembra P-1/V-101 de 50 L de

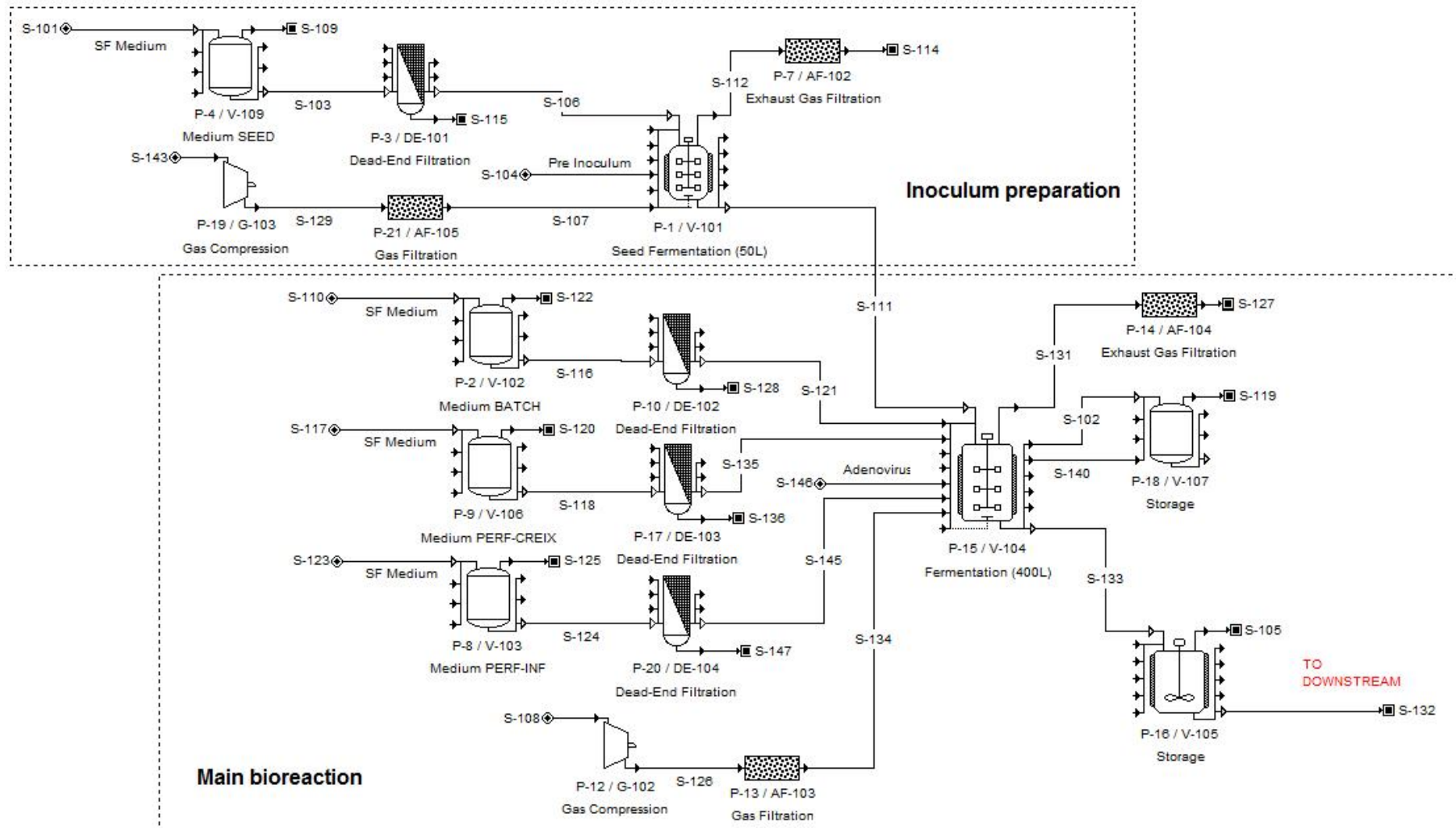


Figura 7.5. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de producció de vectors adenovirals basat en l'alternativa convencional, estratègia en continu amb perfusió, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.). El diagrama consta de dues seccions: a la part superior se situa la zona de preparació d'inòcul i a la part inferior la zona de bioreacció principal.

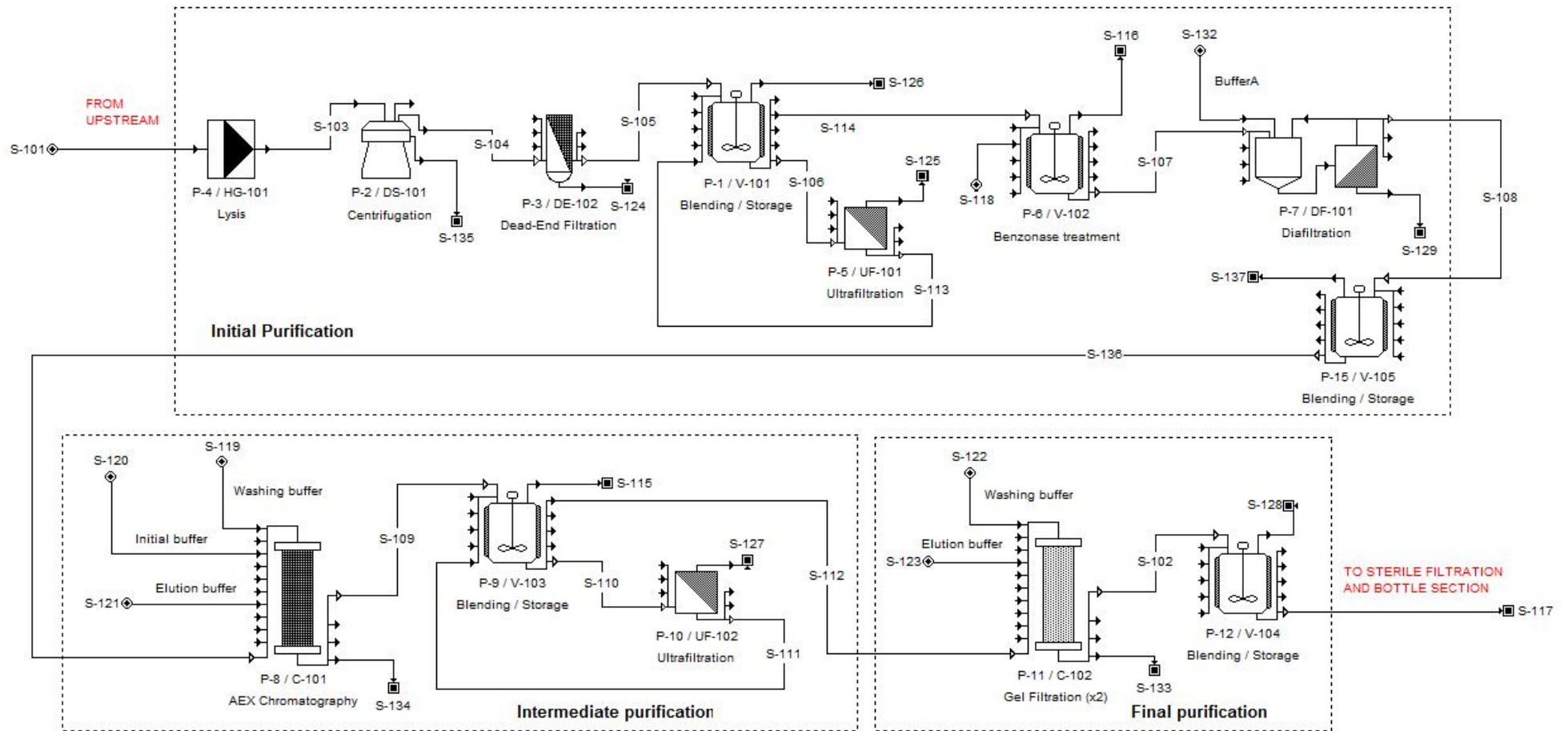


Figura 7.6. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de purificació de vectors adenovirals basat en l'alternativa convencional, estratègia en continu amb perfusió, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.).

capacitat. Inicialment, aquest s'inocula amb un volum de 10 L, el qual s'incrementa fins assolir el seu valor final a través del transvasament del medi lliure de sèrum contingut al tanc d'emmagatzematge P-4/V-109, després de l'operació de filtració redundat de 0,2 µm P-3/DE-101 per assegurar-ne l'esterilitat.

La secció de bioreacció principal alberga un únic bioreactor de 400 L de volum P-15/V-104. Cal destacar que la reducció dràstica del volum de disseny d'aquest equip, respecte l'emprat en l'estratègia en discontinu (8.000 L), és una conseqüència directa de l'augment de la productivitat específica cel·lular descrit al corresponent capítol del present treball. L'addició de medi fresc, el qual circula des del tanc P-2/V-102 a través del filtre esterilitzant P-10/DE-102, juntament amb l'inòcul procedent de l'anterior secció permeten l'inici de la fase de creixement en discontinu del cultiu amb una concentració cel·lular de $1,5 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual evoluciona durant tres dies fins assolir $6 \cdot 10^5$ cell/mL. En aquest instant, es dona començament a la fase de creixement en perfusió amb el medi fresc procedent del tanc P-9/V-106, el qual circula a través del filtre esterilitzant P-17/DE-103. El cultiu prolifera en perfusió durant 6 dies, fins a una concentració cel·lular d'infecció de $100 \cdot 10^5$ cell/mL. Com en l'anterior estratègia, la producció de vectors adenovirals s'inicia amb una MOI de 5 UI/cell, i es perllonga durant dos dies més en perfusió amb l'addició del medi lliure de sèrum provinent del circuit format pel tanc P-8/V-103 i el filtre P-20/DE-104; el títol víric final és de $5,5 \cdot 10^{10}$ UI/mL. Les condicions de cultiu en tots els bioreactors són les desenvolupades a l'apartat 5.4.3 del capítol de producció.

Amb l'objectiu de mantenir un cert marge operacional davant la possibilitat d'algun imprevist, entre l'etapa de producció i la de purificació és necessària la presència del tanc d'emmagatzematge P-16/V-105, on es recull la totalitat del contingut del bioreactor principal (398 L).

El diagrama de procés que caracteritza l'etapa de purificació (veure Figura 7.6) s'estructura en tres seccions, de forma idèntica a l'anteriorment descrita a partir de la Figura 7.2. No obstant, en aquest cas existeix tot un seguit de diferències en el nombre i la mida dels equips emprats, derivades del menor volum a tractar.

D'aquesta manera, la secció de purificació inicial opera de forma exactament igual a la descrita en l'apartat anterior. Tanmateix, a la secció de purificació intermèdia, encara que la columna de cromatografia de bescanvi aniònic P-8/C-101 manté les seves dimensions (diàmetre de 0,6 m i alçada de 0,4 m), doncs la reïna pot assumir l'increment de producte que es dona en aquesta nova estratègia, la segona unitat d'ultrafiltració P-10/UF-102 només cal que concentri 10 vegades per disposar d'un corrent de matèria en les condicions idònies per ésser tractat a la purificació final.

Aquesta última secció resta considerablement simplificada. En primer lloc, per la reducció a dues columnes d'exclusió molecular P-11/C-102, tot mantenint les dimensions anteriorment fixades (diàmetre de 0,4 m i alçada de 0,8 m), la càrrega de les quals implica la utilització del 9% del seu volum. I en segon lloc, perquè no es fa necessària la utilització d'una tercera unitat

d'ultrafiltració, ja que el volum final emmagatzemat al tanc final P-12/V-104 ja permet enviar els vectors adenovirals purs a la zona de filtració esterilitzant i d'envasat en vials de 1 mL.

El diagrama de Gantt amb la programació temporal d'un únic lot, basada en el grau d'utilització de cadascuna de les unitats principals descrites en els diagrames de bioprocés anteriorment proposats, es mostra a la Figura 7.7.

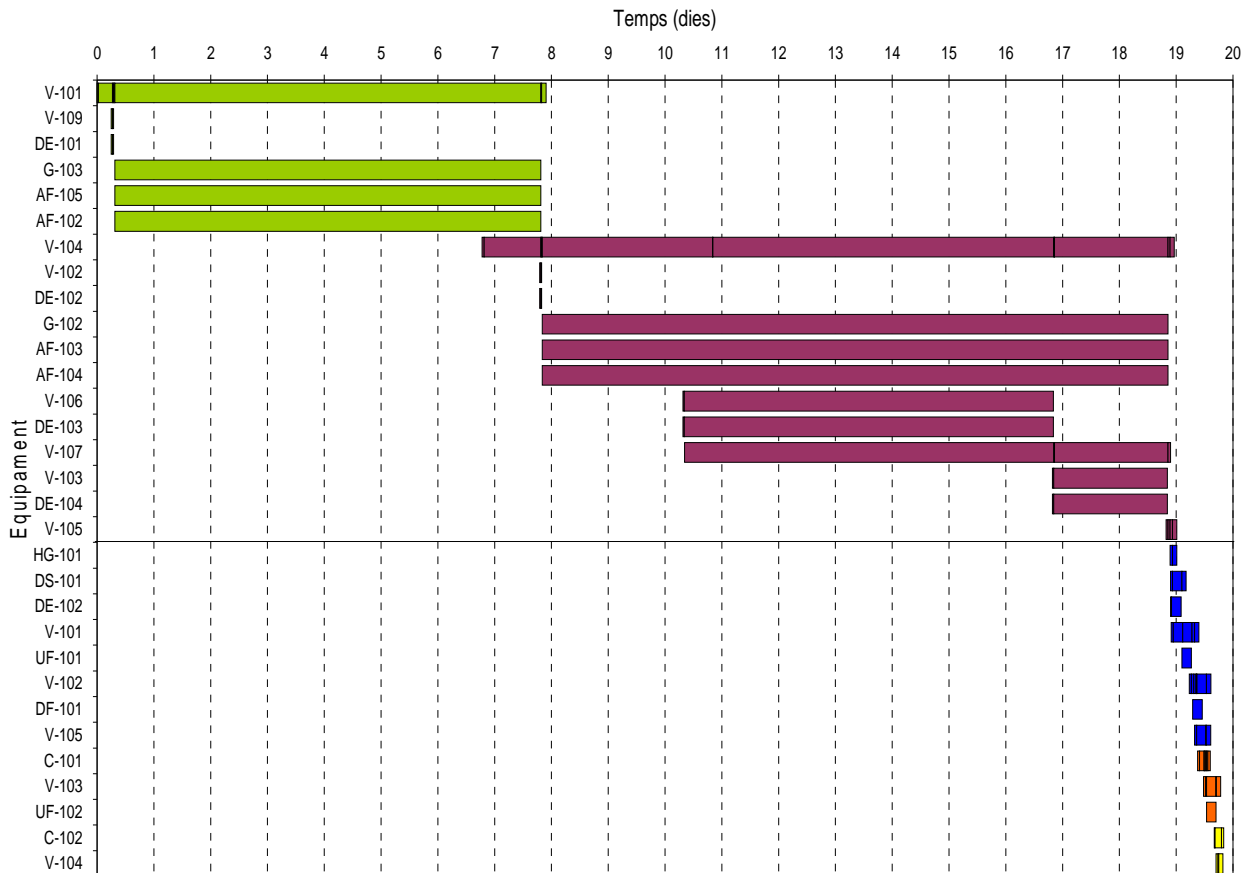


Figura 7.7. Diagrama de Gantt d'utilització d'equips emprant el bioprocés amb l'alternativa convencional, estratègia en continu amb perfusió: secció de preparació de l'inòcul (■), secció de bioreacció principal (■), secció de purificació inicial (■), secció de purificació intermèdia (■) i secció de purificació final (■).

En aquest cas, el temps total del lot resulta de 19,84 dies. El temps parcial de duració de l'etapa productiva és de 19,01 dies, lleugerament inferior al determinat en l'estratègia en discontinu. En canvi, el temps de purificació es redueix ostensiblement fins a 0,97 dies, degut a la disminució del volum de brou de cultiu a processar.

Com a conseqüència, el coll d'ampolla per reiniciar cada nou lot continua situant-se a la producció. En concret, degut a l'elevada duració del cultiu en perfusió, el bioreactor principal P-15/V-104 esdevé ara la unitat limitant, i el lot requereix de 12,19 dies de temps de reinici, la qual cosa limita la capacitat productiva de la planta a 26 lots/any.

La Taula 7.2 resumeix els principals paràmetres de la simulació basada en el bioprocés convencional operant en continu amb perfusió. Els resultats mostren com la capacitat productiva anual de la planta continua sobredimensionada en aproximadament un 5% respecte les bases de disseny fixades a l'apartat 7.1 ($1 \cdot 10^{18}$ PV/any), la qual cosa li atorga un cert grau de flexibilitat front a possibles imprevistos.

Paràmetres de la simulació		
Volum del bioreactor principal (L)		400 (1)
Volum de la columna AEXC (L)		113 (1)
Volum de la columna SEC (L)		100 (2)
Temps de producció (dies)		
		19,01
Temps de purificació (dies)		
		0,97
Temps total del lot (dies)		
		19,84
Temps reinici del lot (dies)		
		12,19
Nombre de lots/any		
		26
Capacitat màxima de la planta	(PV/lot)	$4,03 \cdot 10^{16}$
	(dosis/lot)	40.265
	(PV/any)	$1,05 \cdot 10^{18}$
	(dosis/any)	1.046.890

Taula 7.2. Resultats de simulació del bioprocés convencional, estratègia en continu amb perfusió. Entre parèntesi s'indica el nombre d'unitats de cada equip principal.

7.2.2. Bioprocés no convencional

7.2.2.1. Estratègia en discontinu

El diagrama de bioprocés on es mostra l'etapa de producció (veure Figura 7.8) continua basant la seva estructura entorn de les dues seccions esmentades prèviament: la secció de preparació d'inòcul i la de bioreacció principal i obtenció de vectors adenovirals.

La secció d'inòcul torna a requerir dues fases de canvi d'escala per satisfer les necessitats cel·lulars de la secció de bioreacció principal. La fase inicial comença a partir del bioreactor d'un sol ús de sembra de 100 L de volum nominal P-1/BBS-102, amb un 50% de volum útil. Aquest s'inocula inicialment amb un volum operacional de 10 L, el qual assoleix el seu valor definitiu de 50 L mitjançant l'addició de medi lliure de sèrum des del contenidor de plàstic rebutjable P-18/DCS-101, després de superar la filtració redundant de $0,2 \mu\text{m}$ P-3/DE-101 per assegurar-ne l'esterilitat. La segona fase es constitueix de manera anàloga a l'anterior, el bioreactor de sembra de 1.000 L de capacitat nominal P-14/BBS-103 rep el contingut de l'anterior i el medi fresc procedent del contenidor de plàstic rebutjable P-16/DCS-105, a través del filtre esterilitzant P-4/DE-104.

La secció de bioreacció principal dona cabuda 9 bioreactors d'un sol ús de 1.000 L de capacitat nominal, amb un 50% de volum útil, P-15/BBS-101. Cal esmentar que la capacitat acumulada dels mateixos (9.000 L) resulta inferior a la calculada per a la proposta

convencional operant en discontinu (16.000 L), degut a la millora de la productivitat en la present (veure Taula 5.17 del capítol de producció). L'addició de medi fresc des del contenidor P-2/DCS-102, el qual circula a través del filtre esterilitzant P-10/DE-102, permet l'inici de la fase de creixement del cultiu amb una concentració cel·lular de $1,5 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual progressa durant 5 dies fins assolir $16 \cdot 10^5$ cell/mL. En aquest instant, s'inicia la infecció amb una MOI de 5 UI/cell i l'addició de medi lliure de sèrum equivalent al 10% del volum total dels bioreactors, el qual procedeix del circuit format pel contenidor de plàstic rebutjable P-8/DCS-103 i el filtre P-17/DE-103. El temps de recollida és de 48 h postinfecció, amb un títol víric final de $3,2 \cdot 10^9$ UI/mL. Les condicions de cultiu en tots els bioreactors són les desenvolupades a l'apartat 5.5.1 del capítol de producció. El brou de cultiu contingut en els bioreactors principals (4.990 L) es transfereix al contenidor de plàstic rebutjable P-9/DCS-104 en espera d'iniciar l'etapa de purificació.

Novament, el considerable volum a purificar, fa que el diagrama de procés proposat per fer front a aquesta etapa (veure Figura 7.9) presenti un elevat grau de similitud respecte el descrit a partir de l'alternativa convencional operant en discontinu (veure Figura 7.2), en quant a la seva estructura i les operacions unitàries integrants de cadascuna de les tres seccions. A nivell d'equips, destaca la substitució dels tancs d'emmagatzematge convencionals pels contenidors de plàstic rebutjable P-1/DCS-101, P-17/DCS-102, P-18/DCS-103, P-20/DCS-105 i P-19/DCS-104.

En base a la quantitat de producte a tractar, la secció de purificació inicial es manté inalterada respecte els diagrames de procés descrits fins al moment. La secció de purificació intermèdia manté una única columna de bescanvi aniònic per capturar els vectors adenovirals (P-8/C-101) sense modificar les dimensions especificades fins al moment (diàmetre de 0,6 m i alçada de 0,4 m). No obstant, la unitat d'ultrafiltració P-10/UF-102 concentra 20 vegades l'aliment que rep. Per últim, l'elevat volum que alimenta la secció de purificació final obliga a disposar de 10 columnes d'exclusió molecular P-11/C-102, perquè la seva càrrega impliqui només la utilització del 11% del seu volum, tot mantenint les dimensions anteriorment especificades (diàmetre de 0,4 m i alçada de 0,8 m). Aquesta es troba seguida per la tercera unitat d'ultrafiltració P-12/UF-103, on s'obtenen els virions purs en un concentrat 10 vegades menor a l'aliment i en condicions d'ésser enviat cap a la zona de filtració esterilitzant i d'envasat en vials de 1 mL.

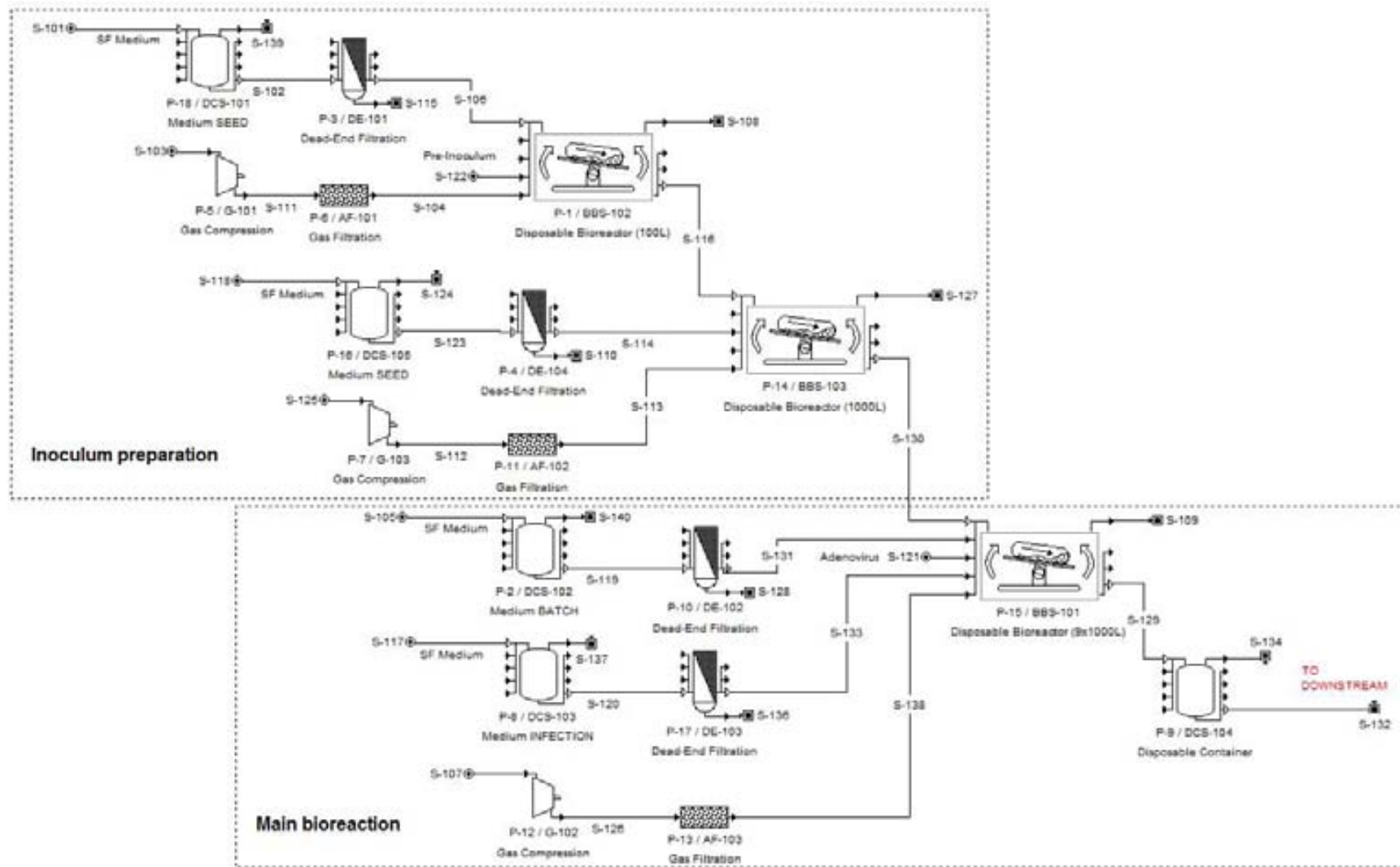


Figura 7.8. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de producció de vectors adenovirals basat en l'alternativa no convencional, estratègia en discontinu, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.). El diagrama consta de dues zones principals: a la part superior se situa la zona de preparació d'indòcul i a la part inferior la zona de bioreacció principal.

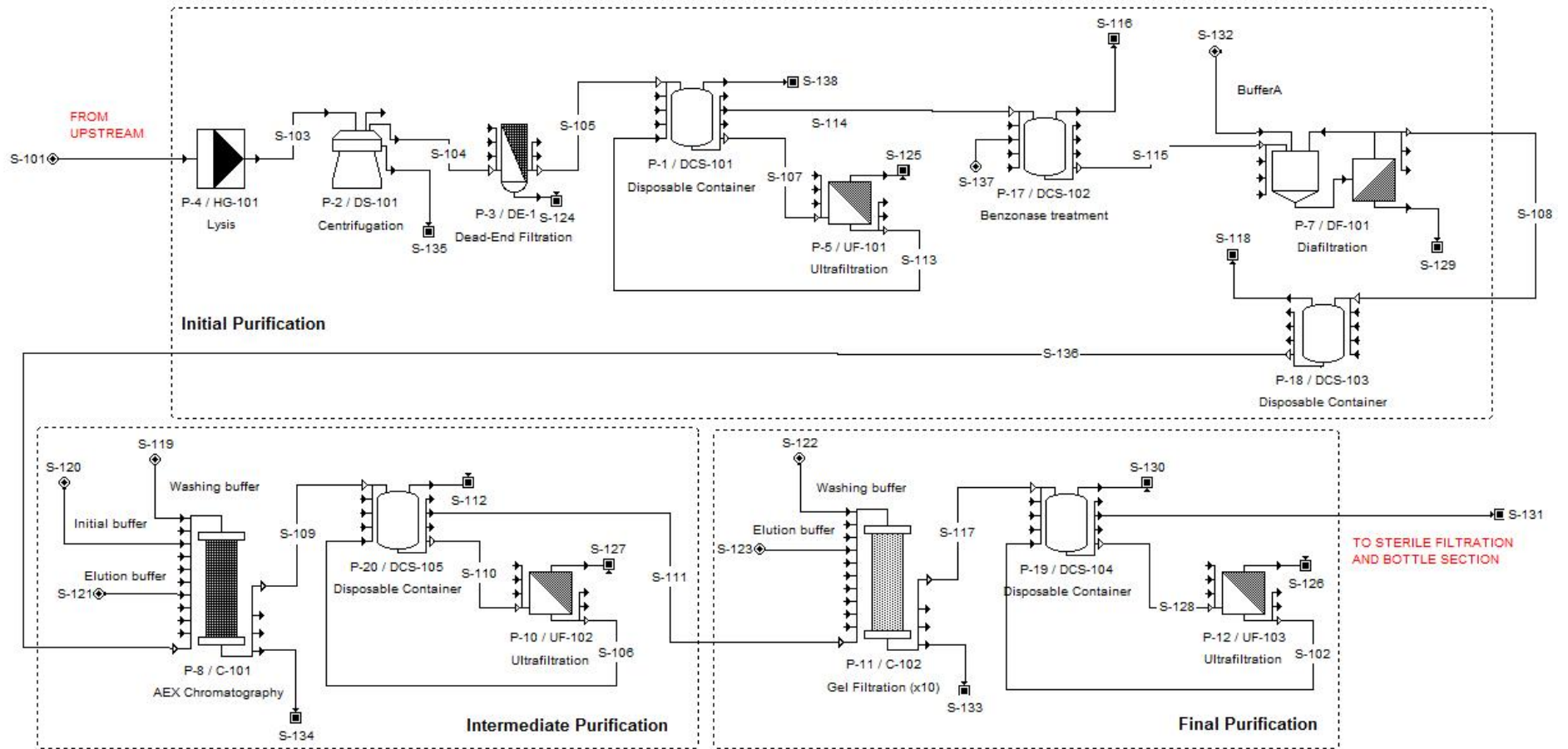


Figura 7.9. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de purificació de vectors adenovirals basats en l'alternativa no convencional, estratègia en discontinu, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.).

El diagrama de Gantt amb la programació temporal d'un lot, basada en el grau d'utilització de cadascuna de les unitats principals descrites en els diagrames de bioprocés proposats per a aquesta alternativa, es mostra a la Figura 7.10.

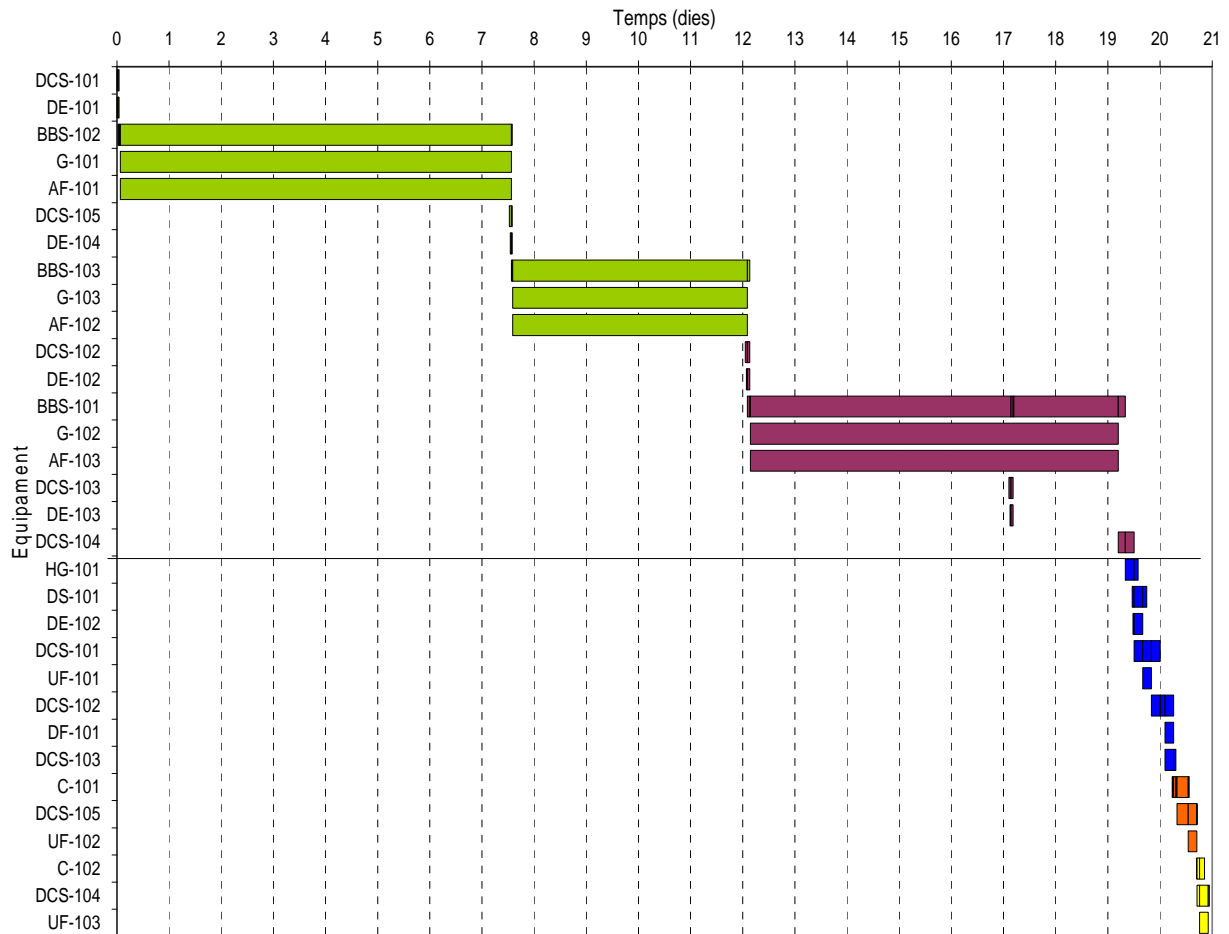


Figura 7.10. Diagrama de Gantt d'utilització d'equips emprant el bioprocés amb l'alternativa no convencional, estratègia en discontinu: secció de preparació de l'inòcul (■), secció de bioreacció principal (■), secció de purificació inicial (■), secció de purificació intermèdia (■) i secció de purificació final (■).

Comparativament amb el bioprocés convencional operant en discontinu, queden palesos els avantatges que aporta la tecnologia d'un sol ús al bioprocés. L'eliminació de les operacions de preparació, esterilització i neteja (SET-UP, SIP i CIP) de la major part d'unitats principals, com els bioreactors, provoca una reducció de la durada del procés. Tampoc no cal oblidar que la reducció del volum a tractar al llarg del procés té un efecte positiu sobre la durada de les operacions de trafegament de fluid.

D'aquesta manera, el temps total del lot és de 20,95 dies, un 1,4% inferior al mateix paràmetre per a la proposta convencional. Aquesta diferència, a priori minsa, es deu a l'increment de temps en l'etapa productiva de fins a 19,50 dies, a causa del perllongament d'un dia més en l'operació de bioreacció principal de la unitat P-15/BBS-101, juntament amb la disminució considerable del temps de purificació fins a 1,61 dies, donat el menor volum de brou de cultiu a processar.

En el temps de reinici, el qual pren un valor de 7,56 dies, sí s'observa una reducció més considerable del 4,4% respecte de la mateixa dada convencional en discontinu. Aquest període torna a coincidir amb el temps d'utilització del primer bioreactor de sembra P-1/BBS-102, el qual es considera la unitat limitant de tot el procés. La conseqüència més directa de la variació en els paràmetres és l'augment de la capacitat de la planta fins a 41 lots/any.

La Taula 7.3 resumeix els principals paràmetres de la simulació basada en la proposta no convencional operant en discontinu. Els resultats mostren com la capacitat productiva anual de la planta continua sobredimensionada en aproximadament un 5% respecte les bases de disseny fixades a l'apartat 7.1 ($1 \cdot 10^{18}$ PV/any).

Paràmetres de la simulació		
Volum del bioreactor principal (L)*	1.000 (9)	
Volum de la columna AEXC (L)	113 (1)	
Volum de la columna SEC (L)	110 (10)	
Temps de producció (dies)		
	19,50	
Temps de purificació (dies)		
	1,61	
Temps total del lot (dies)		
	20,95	
Temps reinici del lot (dies)		
	7,56	
Nombre de lots/any		
	41	
Capacitat màxima de la planta	(PV/lot)	$2,56 \cdot 10^{16}$
	(dosis/lot)	25.554
	(PV/any)	$1,05 \cdot 10^{18}$
	(dosis/any)	1.047.714

Taula 7.3. Resultats de simulació del bioprocés no convencional, estratègia en discontinu. Entre parèntesi s'indica el nombre d'unitats de cada equip principal. * Volum nominal.

7.2.2.2. Estratègia en continu amb perfusió

L'última alternativa proposada per al bioprocés també es divideix en dos diagrames, l'etapa de producció (veure Figura 7.11) i la de purificació (veure Figura 7.12).

L'etapa de producció continua basant la seva estructura en les dues seccions esmentades prèviament: la secció d'inòcul i la de bioreacció principal i obtenció de vectors adenovirals. La secció d'inòcul té com a unitat més important un únic bioreactor no convencional de sembra de 50 L de capacitat nominal, amb un 50% de volum útil, P-1/BBS-102. La seva inoculació es realitza amb un volum inicial de 5 L, el qual assoleix un valor definitiu de 25 L mitjançant l'addició de medi lliure de sèrum des del contenidor plàstic de plàstic rebutjable P-18/DCS-101, després de circular a través del filtre redundat de $0,2 \mu\text{m}$ P-3/DE-101 per assegurar-ne l'esterilitat.

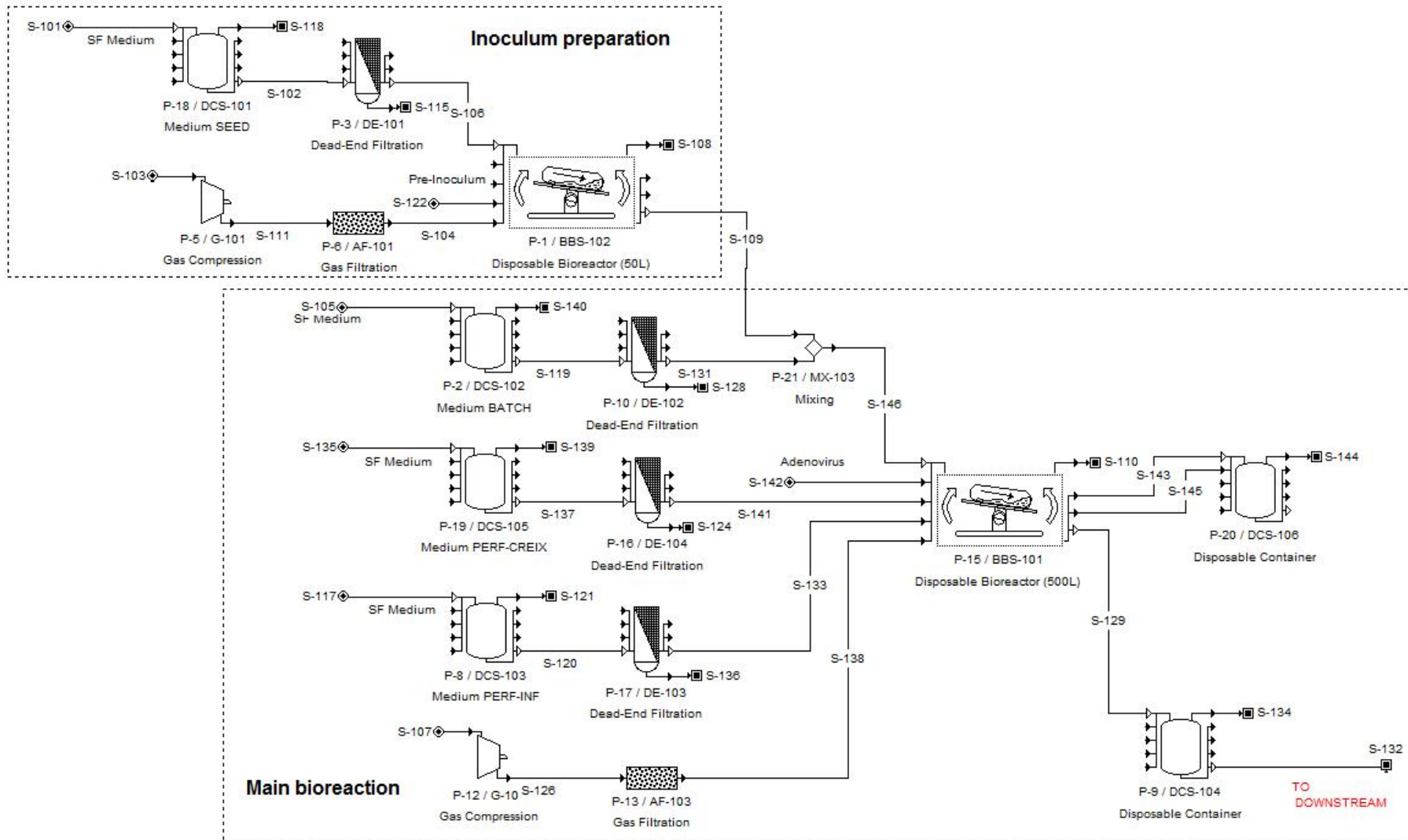


Figura 7.11. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de producció de vectors adenovirals basat en l'alternativa no convencional, estratègia en continu amb perfusió, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.). El diagrama consta de dues zones principals: a la part superior se situa la zona de preparació d'inòcul i a la part inferior la zona de bioreacció principal.

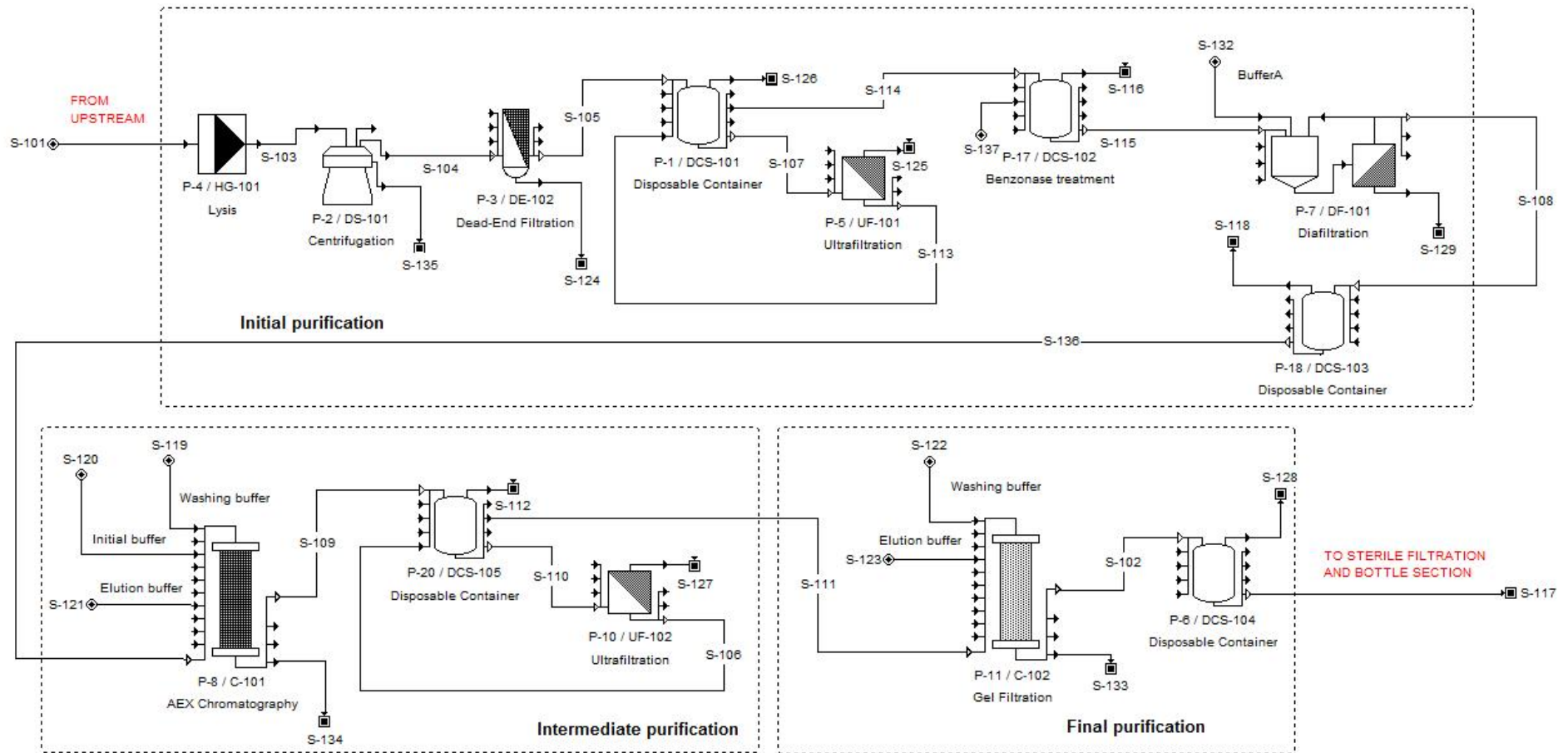


Figura 7.12. Diagrama de bioprocés proposat per a l'etapa de purificació de vectors adenovirals basat en l'alternativa no convencional, estratègia en continu amb perfusió, implementat amb el simulador de processos SuperPro Designer (Intelligen Inc.).

La secció de bioreacció principal acull el bioreactor no convencional de 500 L de capacitat total, amb un 50% de volum útil, P-15/BBS-101. Aquesta esdevé la unitat de producció més reduïda de totes les descrites fins al moment, a causa de la major productivitat específica cel·lular avaluada. L'addició de medi, el qual circula des del contenidor de plàstic rebutjable P-2/DCS-102 a través del filtre esterilitzant P-10/DE-102, permet l'inici de la fase de creixement en discontinu del cultiu amb una concentració cel·lular de $1,5 \cdot 10^5$ cell/mL, la qual s'incrementa durant tres dies fins assolir $6 \cdot 10^5$ cell/mL. En aquest instant, s'inicia la fase de creixement en perfusió amb el medi d'alimentació fresc procedent del contenidor P-19/DCS-105, el qual s'alimenta a través del filtre esterilitzant P-16/DE-104. El cultiu creix en perfusió durant 6 dies fins a una concentració cel·lular d'infecció de $100 \cdot 10^5$ cell/mL. Com en les anteriors propostes, l'inici de la infecció es dona amb una MOI de 5 UI/cell; aquesta fase perllonga la perfusió durant dos dies més, amb l'addició de medi lliure de sèrum procedent del conjunt format pel contenidor de plàstic rebutjable P-8/DCS-103 i el filtre P-17/DE-103. El títol víric en finalitzar el procés és de $7 \cdot 10^{10}$ UI/mL. Les condicions de cultiu en tots els bioreactors són les desenvolupades a l'apartat 5.5.2 del capítol de producció. El brou de cultiu final (248 L) es transfereix al contenidor de plàstic rebutjable P-9/DCS-104 en espera d'iniciar l'etapa de purificació.

A causa del volum a processar, el diagrama de procés dissenyat per fer front l'etapa de purificació (veure Figura 7.12) presenta un elevat grau de similitud amb el ressenyat emprant el sistema de producció convencional operant en continu amb perfusió (veure Figura 7.6), en relació a la seva estructura i les operacions unitàries integrants de cadascuna de les tres seccions. A nivell d'equips, destaca la substitució dels tancs d'emmagatzematge convencionals per contenidors de plàstic rebutjable P-1/DCS-101, P-17/DCS-102, P-18/DCS-103, P-20/DCS-105 i P-6/DCS-104.

Pel que fa al funcionament de cadascuna de les seccions, tant la inicial com la intermèdia romanen inalterades respecte les que es descriuen a la Figura 7.6, ja que, com s'ha dit, han de processar un volum d'aliment inicial del mateix ordre de magnitud. No obstant, el corrent que accedeix a la secció de purificació final permet disposar d'una única columna d'exclusió molecular P-11/C-102 amb les dimensions anteriorment fixades (diàmetre de 0,4 m i alçada de 0,8 m), la càrrega de la mateixa representa un 12% del seu volum. El corrent amb els vectors adenovirals purs que elueix d'aquesta columna s'emmagatzema al contenidor de plàstic rebutjable P-6/DCS-104 per enviar-lo seguidament cap a la zona de filtració esterilitzant i d'envasat en vials de 1 mL.

El diagrama de Gantt amb la programació temporal d'un lot, basada en el grau d'utilització de cadascuna de les unitats principals descrites en els diagrames de bioprocés proposats per a aquesta alternativa, es mostra a la Figura 7.13.

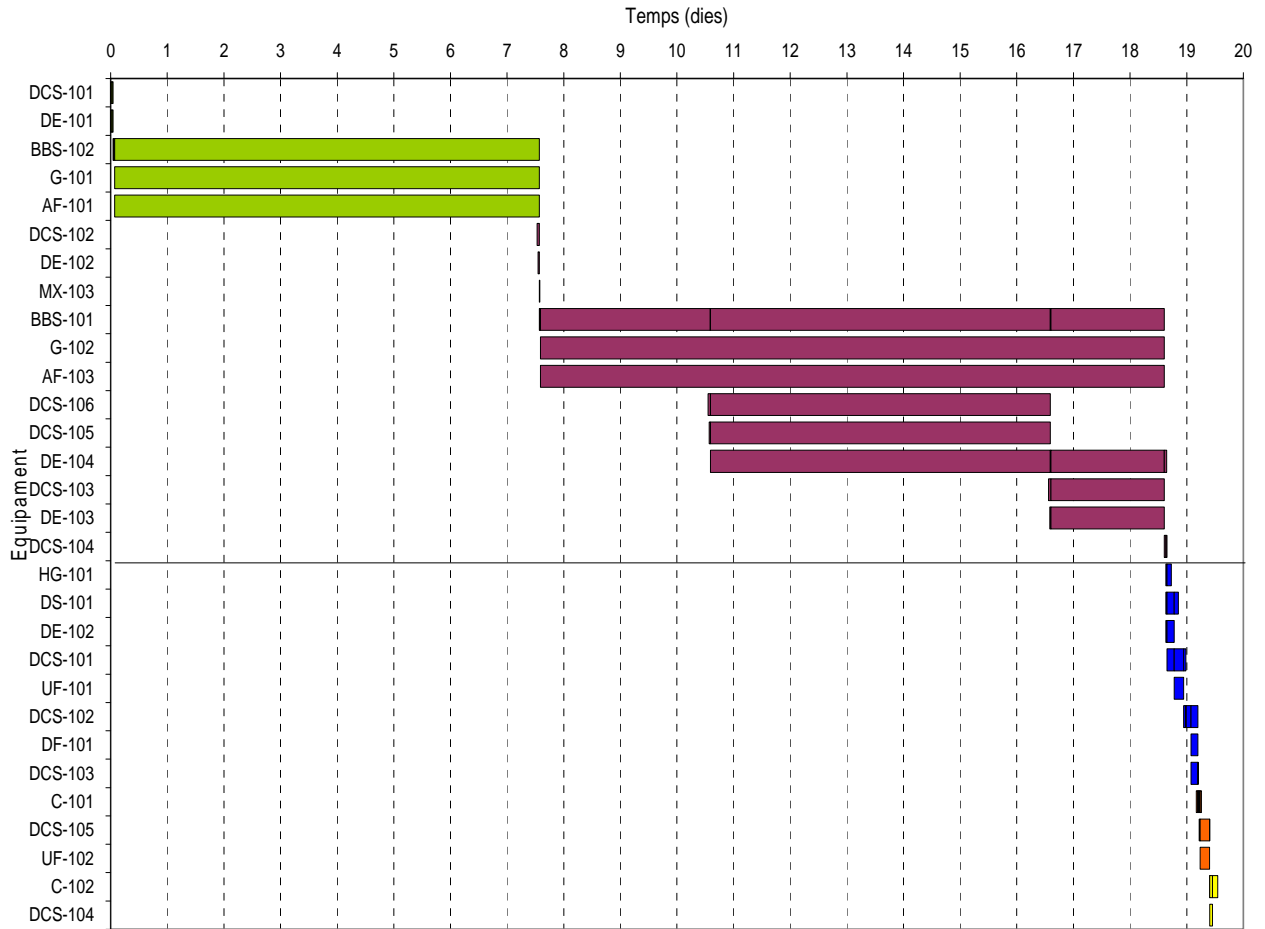


Figura 7.13. Diagrama de Gantt d'utilització d'equips emprant el bioprocés amb l'alternativa no convencional, estratègia en continu amb perfusió: secció de preparació de l'inòcul (vermell), secció de bioreacció principal (blau), secció de purificació inicial (verd), secció de purificació intermèdia (negre) i secció de purificació final (groc).

En aquest cas, l'eliminació de les operacions de preparació, esterilització i neteja redueix la durada de totes i cadascuna les variables temporals avaluades, respecte les anteriors propostes. Així, en comparació amb l'alternativa convencional operant en continu amb perfusió, el temps total del lot es redueix un 1,4%, fins als 19,57 dies, donada la reducció tant del temps parcial de producció (18,65 dies) com de purificació (0,92 dies). Novament, el paràmetre temporal més sensible és el temps de inici, el qual es redueix en un 9,3% fins assolir un valor de 11,06 dies, coincidint amb el temps d'utilització del bioreactor principal P-15/BBS-101. Com en les anteriors ocasions, aquesta disminució repercuteix ostensiblement en la capacitat productiva de la planta, on el nombre de lots per any augmenta fins a 28.

La Taula 7.4 resumeix els principals paràmetres de la simulació basada en l'alternativa no convencional operant en continu amb perfusió. Els resultats mostren com la capacitat productiva anual de la planta, com la resta d'alternatives, es troba sobredimensionada en aproximadament un 5% respecte les bases de disseny fixades a l'apartat 7.1 ($1 \cdot 10^{18}$ PV/any).

Paràmetres de la simulació		
Volum del bioreactor principal (L)*	500 (1)	
Volum de la columna AEXC (L)	113 (1)	
Volum de la columna SEC (L)	100 (1)	
Temps de producció (dies)	18,65	
Temps de purificació (dies)	0,92	
Temps total del lot (dies)	19,57	
Temps reinici del lot (dies)	11,06	
Nombre de lots/any	28	
Capacitat màxima de la planta	(PV/lot)	$3,75 \cdot 10^{16}$
	(dosis/lot)	37.479
	(PV/any)	$1,05 \cdot 10^{18}$
	(dosis/any)	1.049.412

Taula 7.4. Resultats de simulació del bioprocés no convencional, estratègia en continu amb perfusió. Entre parèntesi s'indica el nombre d'unitats de cada equip principal. * Volum nominal.

7.3. Avaluació econòmica

L'avaluació econòmica i l'anàlisi de costos tenen una importància cabdal en el desenvolupament de qualsevol bioprocés per un elevat nombre de raons. Principalment si es tracta d'un producte innovador, com és el cas de vectors adenovirals per a teràpia gènica, qualsevol empresa que prengui la iniciativa de portar el seu projecte d'obtenció a escala necessita efectuar aquesta anàlisi per optar entre la construcció d'una planta productiva pròpia, o bé per subcontractar l'obtenció a una CMO, la qual actuarà estrictament sota les indicacions del client.

A priori, la construcció i operació d'una planta pròpia específicament dissenyada per a la manufactura atorga *know-how* i independència productiva, tot deixant a banda la ingerència de tercers. Com a contrapartida, però, pot derivar en una inversió econòmica molt més cara i perllongada en el temps. Aquest fet, afavoreix l'externalització del bioprocés vers les esmentades CMOs, sota estrictes condicions de confidencialitat, les quals realitzen una proposta de preu final per lot, bàsicament, a partir de les necessitats de matèria prima i del grau d'utilització dels seus equips i personal, donat que les seves instal·lacions es troben plenament operatives [1].

Per tant, per prendre una decisió assenyada, s'ha de disposar d'informació econòmica fidedigna sobre la inversió de capital necessària (costos d'inversió), els costos d'operació i la previsió d'ingressos en un escenari temporal objectiu, on existeixi rendibilitat per al projecte. En aquest aspecte, el simulador de processos SuperPro Designer, el qual ha proporcionat les dades de dimensionament dels equips i quantificació de reactius necessaris a partir de la resolució dels balanços de matèria aplicats a les diferents alternatives avaluades fins al moment, també permet realitzar la corresponent avaluació econòmica de cadascuna.

Dins de l'apartat 10.2 del capítol d'apèndix, es poden trobar totes les taules resum dels costos dels equips, de les matèries primeres, del material fungible, dels salaris dels treballadors, etc..., les quals han estat emprades per confeccionar l'avaluació econòmica.

7.3.1. Costos

7.3.1.1. Costos d'inversió

Els costos d'inversió de qualsevol de les quatre alternatives proposades es divideix en dues partides pressupostàries ben diferenciades: el capital immobilitzat i el capital circulat. La primera partida contempla els costos associats a la construcció de la planta, i la segona els associats a aspectes bàsics perquè aquesta es mantingui plenament operativa.

A continuació, es detalla la composició de cadascuna, i com es realitza el seu càlcul.

7.3.1.1.1. Capital immobilitzat

Per facilitar la seva estimació, el capital immobilitzat s'organitza en tres tipus: els costos d'immobilitzat directe, els costos d'immobilitzat indirecte i altres costos, tal i com es pot observar a la Taula 7.5.

Partida	Cost (Multiplicador)		
	Rang òptim	Bioprocés convencional	Bioprocés no convencional
COSTOS IMMOBILITZAT DIRECTE (CID)			
1. Cost dels equips (CE)	Suma de costos individuals		
2. Instal·lació	Suma de costos individuals		
3. Conduccions i connexions	0,30 – 0,60	0,45 · CE	0,30 · CE
4. Instrumentació	0,20 – 0,60	0,40 · CE	0,20 · CE
5. Aïllament	0,01 – 0,05	0,03 · CE	0,02 · CE
6. Electricitat	0,10 – 0,20	0,15 · CE	0,10 · CE
7. Edificis	0,10 – 2,00	1,50 · CE	1,50 · CE
8. Condicionament terrenys	0,05 – 0,20	0,15 · CE	0,15 · CE
9. Serveis auxiliars	0,20 – 1,00	0,60 · CE	0,30 · CE
COSTOS IMMOBILITZAT INDIRECTE (CII)			
10. Enginyeria	0,20 – 0,30	0,25 · CID	0,25 · CID
11. Construcció	0,30 – 0,40	0,35 · CID	0,20 · CID
ALTRES COSTOS (AC)			
12. Taxes del contractista	0,03 – 0,08	0,05 · (CID+CII)	0,05 · (CID+CII)
13. Imprevistos	0,07 – 0,15	0,10 · (CID+CII)	0,10 · (CID+CII)

Taula 7.5. Distribució de les diferents partides que componen el capital immobilitzat. Valors dels multiplicadors emprats en les diferents alternatives analitzades, d'acord amb el rang òptim comunament acceptat per a la indústria biotecnològica [6].

A continuació es procedeix a descriure detalladament cadascun.

- Costos d'immobilitzat directe (CID): són aquells costos d'inversió directament associats a les instal·lacions o a qualsevol element físic no humà que integrarà la futura planta. Comprèn nou partides diferents: cost dels equips, instal·lació dels mateixos, conduccions i connexions, instrumentació, aïllament, electricitat, edificis, condicionament de terrenys i serveis auxiliars.

Els costos de cadascuna de les partides s'obtenen de la suma dels preus acordats amb cadascun dels proveïdors encarregats de realitzar les diferents tasques. Tanmateix, per obtenir unes dades preliminars, encara que bastant fidedignes, totes les partides, a excepció de les dues primeres, es poden estimar en base al cost total dels equips (CE) corregit per un coeficient anomenat multiplicador. El multiplicador, tal i com es mostra a la Taula 7.5, presenta un rang de valors conegut fruit de l'experiència en instal·lacions similars [1, 6].

La decisió sobre el valor final de cada multiplicador per realitzar l'estimació depèn de la naturalesa del procés. En el present capítol, es decideix prendre un valor mitjà per al cas de les dues alternatives convencionals. No obstant, pel que fa a la resta d'alternatives no convencionals, es decideix aplicar multiplicadors que es trobin a la banda inferior o presentin un valor que sigui un 50% menor a la dada mitja, d'acord amb el treball publicat per Shahidi i col., on es posa de manifest que s'assoleix un estalvi aproximat d'un 50% en les noves plantes basades en tecnologia d'un sol ús [7]. Aquesta és, sens dubte, una decisió molt important que tindrà molt d'impacte sobre l'anàlisi econòmica efectuada.

Pel que fa a la partida d'Edificis, es dona una excepció. Aquesta presenta el rang de multiplicador més ampli de tots els conceptes presents a la Taula 7.5, la qual cosa posa de manifest els costos tan variables de les instal·lacions en la indústria biotecnològica. Aquestes han d'assegurar la qualitat requerida pel producte, d'acord amb la seva aplicació final. En el cas dels vectors adenovirals destinats a teràpia humana, les instal·lacions de producció i purificació han de complir estrictament els màxims estàndards de qualitat i seguretat, per la qual cosa el valor del multiplicador es troba a la zona alta del rang (1,5 vegades el cost dels equips).

Donat que la base per a l'estimació econòmica és el cost de cadascun dels equips que operaran a la planta, la seva estimació ha de ser el més acurada possible. El simulador calcula el cost dels equips a partir d'una base de dades interna amb preus actualitzats procedents d'un elevat nombre de proveïdors i de publicacions especialitzades [8, 9]. Sovint, per a molts equips només existeixen dades de preu discretes, només disponibles per a certes dimensions característiques (volum, àrea, etc...). En el cas que les dimensions d'una nova unitat dissenyada no coincideixin amb les de la base de dades, el seu cost es corregeix segons l'Equació 7.1.

$$Cost_2 = Cost_1 \cdot \left(\frac{Mida_2}{Mida_1} \right)^a$$

Equació 7.1. Expressió per a la correcció del cost d'un equip (2), a partir del valor conegut a la base de dades (1) i de les mides característiques d'ambdós. L'exponent (a) es troba habitualment en el rang 0,5 - 1,0, amb un valor característic de 0,6.

- Costos d'immobilitzat indirecte (CII): són aquells costos d'inversió que no estan associats a cap zona física de la planta ni equip, ja sigui aquest últim principal o auxiliar. Corresponen bàsicament a dues partides: Enginyeria, on s'inclou el disseny íntegre de la planta, i Construcció, on s'inclou l'execució del projecte sobre el terreny.

Els CII es calculen aplicant un coeficient al valor calculat dels costos d'immobilitzat directe. En el cas de la partida Construcció, davant la major simplicitat a l'hora d'implementar les instal·lacions amb equips no convencionals (sense necessitat de CIP ni SIP) s'assumeix el 20% del CID, mentre que en les propostes basades en sistemes convencionals es fixa en el 35% del CID. En canvi, en el cas d'Enginyeria es fixa en el 25% del CID per a ambdós casos.

- Altres costos (AC): es troben constituïts pels costos que representen els guanys de l'empresa constructora (Taxes del contractista), així com la partida pressupostària destinada als possibles Imprevistos que puguin sorgir en el procés de construcció de la planta.

Aquests costos es calculen a partir d'aplicar els multiplicadors a la suma dels costos d'immobilitzat directe i indirecte (CID i CII), que es fixen en un 5% per a l'Enginyeria i un 10% per fer front als possibles Imprevistos, en totes les alternatives proposades.

7.3.1.1.2. Capital circulant

Com s'ha esmentat anteriorment, a banda del capital immobilitzat, els costos d'inversió també han de fer front el pagament de diversos conceptes, molts dels quals no tenen perquè estar relacionats amb una unitat física concreta. La partida econòmica que satisfà aquests costos és el capital circulant (CC).

El capital circulant es divideix bàsicament en tres partides: el capital de treball, arrencada i validació i R+D+i, tal i com es pot observar a la Taula 7.6 a continuació.

Partida	Cost (Multiplicador)		
	Rang òptim	Bioprocés convencional	Bioprocés no convencional
1. Capital de treball	Costos per mantenir planta operativa 30 dies		
2. Arrencada i validació	0,05 – 0,10	0,05 · CI	0,025 · CI
3. R+D+i (€)	-	400.000	400.000

Taula 7.6. Distribució de les diferents partides que componen el capital circulant. Valors dels multiplicadors emprats en les diferents alternatives analitzades, d'acord amb el rang òptim comunament acceptat per a la indústria biotecnològica [6].

Com es pot observar, la determinació dels costos de cadascuna de les partides resulta molt més heterogeni que per al cas del capital immobilitzat.

- El capital de treball es calcula en funció dels costos d'operació (mà d'obra, matèries primeres, serveis, etc...), donat que consisteix en els costos per mantenir la planta en funcionament durant un determinat període de temps que pot oscil·lar entre un i tres mesos [6]. D'aquesta manera, es dota la planta d'un marge temporal, on pugui continuar operant encara que sorgeixi algun tipus de contratemps amb el seu proveïment.

En totes les alternatives, es valora el capital de treball en un cost equivalent al cost d'operació de 30 dies.

- El cost d'arrencada i validació considera, per una banda, les despeses necessàries per superar el període de temps transcorregut entre que la planta comença a funcionar i esdevé plenament productiva i, d'altra banda, aquelles necessàries per a la superació de l'exigent procés de verificació per part de les autoritats reguladores (EMEA i/o FDA). Aquesta despesa normalment es calcula entre el 5% i el 10% del capital immobilitzat.

En el cas de les dues propostes basades en el bioprocés convencional s'assumeix un 5% del CI, mentre que en les propostes no convencionals es redueix fins al 2,5% del CI, davant la major facilitat per superar el procés de validació, en minimitzar la presència d'etapes de neteja i esterilització, entre d'altres raons.

- L'últim cost que es considera dins l'apartat del capital circulant, és el cost de recerca, desenvolupament i innovació (R+D+i), imprescindible per optimitzar contínuament el bioprocés i mantenir la seva competitivitat.

Aquest cost es considera fix per a tots els casos estudiats i es valora en 400.000 €.

7.3.1.2. Costos d'operació

Els costos d'operació són la suma de tots els costos associats al funcionament diari de la planta per a l'obtenció del producte, de manera que esdevenen proporcionals a la quantitat de producte que s'obté. Segons el seu grau de relació amb en el funcionament diari de la planta, els costos d'operació s'organitzen en dos tipus: els costos d'operació directes i indirectes, tal i com es pot observar a la Taula 7.7.

- Costos d'operació directes (COD): són aquells costos directament associats al funcionament normal de la planta. Inclouen sis partides diferents: matèries primeres, personal, anàlisi i qualitat, material fungible o d'un sol ús, tractament de residus i serveis. Aquesta última partida és diferent a la que figura en els costos d'immobilitzat, i fa referència a allò que produeixen els equips auxiliars (vapor, electricitat, aigua de refrigeració, etc...), els cost físic dels quals es contempla en el capital immobilitzat.

Aquests costos s'avaluen directament mitjançant el programari de forma diferent. La introducció del preu unitari de les matèries primeres, del material fungible, del tractament de residus i dels serveis permet el càlcul d'aquestes partides. El cost del personal que

treballa a les instal·lacions es comptabilitza a partir del nombre d'operaris assignat a cada equip i operació que té lloc, del seu temps total de funcionament i d'un cost salarial mitjà de 100 €/h. Per últim, la partida d'Anàlisi i qualitat es considera fixa per a tots els casos estudiats i es valora en un 15% del cost de personal.

- Costos d'operació indirectes (COI): a diferència de la categoria anterior, la manca de pagament dels COI no atura el funcionament normal de la planta. La principal partida que els conforma és la referent al cost de les instal·lacions o amortització. L'amortització és el cost referit a la desvalorització del capital immobilitzat amb el temps d'operació de la planta. Aquesta desvalorització és deguda a l'obsolescència dels equips i la tecnologia de la que disposa la planta. Hi ha diferents mètodes de càlcul de l'amortització: mètode lineal (amortització constant al llarg dels anys fixats) o mètodes corregits que disminueix el valor de l'amortització puntual anual a mesura que passa el temps. El període d'amortització se situa entre els 10 anys i els 20 anys, no és aconsellable superar aquest termini.

En el present treball es fixa el temps d'amortització en 10 anys, igual al temps de vida de la planta, amb una estimació de tipus lineal.

Finalment, en aquesta categoria i dins de la partida anomenada Miscel·lània, s'inclouen costos tan diversos com els associats a patents, publicitat i vendes, transport, etc... Aquesta partida no es considera en cap de les simulacions realitzades, ja que és difícil de valorar i es creu que no aportaria cap canvi substancial en el resultat final, ja que seria estrictament el mateix valor per a totes les alternatives.

Partida	Cost
COSTOS D'OPERACIÓ DIRECTES (COD)	
1. Matèries primeres	Suma de costos individuals en base als preus unitaris
2. Personal (Mà d'obra)	Suma de costos individuals en base al salari per hora
3. Anàlisi i qualitat	15% del cost de personal
4. Material fungible	Suma de costos individuals en base als preus unitaris
5. Tractament de residus	Suma de costos individuals en base als preus unitaris
6. Serveis	Suma de costos individuals en base als preus unitaris
COSTOS D'OPERACIÓ INDIRECTES (COI)	
7. Instal·lacions (Amortització)	Amortització lineal a 10 anys
8. Miscel·lània	-

Taula 7.7. Distribució de les diferents partides que componen els costos d'operació.

7.3.2. Ingressos

La quantificació dels ingressos generats per la comercialització del producte final és relativament complexa, degut a la dificultat per fixar un preu unitari de venda en el mercat. Aquest fet sorgeix com a conseqüència de la manca d'exploració comercial de productes destinats a teràpia gènica basats en la utilització de vectors adenovirals com a principi actiu, els quals es trobin disponibles actualment en el mercat europeu o americà i hagin estat aprovats per les respectes entitats reguladores (EMEA i FDA).

Per solucionar aquest inconvenient, es pren com a referència novament la Gendicina, com a únic producte adquirible només a la Xina. Segons publicacions que van analitzar l'estat de penetració d'aquest producte al mercat xinès a finals de l'any 2007 [10], el preu per dosi es fixava en 3.800 yuan (252 £). De manera que com a preu unitari de venda per realitzar l'avaluació econòmica es pren un valor de 300 € per dosi.

7.3.3. Anàlisi de rendibilitat

L'estimació dels costos i dels ingressos permet dirigir l'avaluació econòmica de qualsevol projecte vers l'estudi del seu grau de viabilitat econòmica i atractiu des del punt de vista financer. Aquest objectiu s'assoleix gràcies a la utilització de l'anàlisi de rendibilitat.

Existeixen diversos paràmetres de rendibilitat que permeten definir la viabilitat del projecte, tot comparant les diferents propostes d'inversió i escollint a priori la que ha de proporcionar una major rendibilitat de la inversió que es realitza. Els més senzills es basen en la determinació del Benefici Brut i del Benefici Net de la inversió (veure Equació 7.2 i Equació 7.3 respectivament). La diferència entre aquests radica en la consideració dels impostos, fixats en un 30% de la base imposable per a tots els casos.

$$\text{Benefici Brut} = \text{Ingressos} - \text{Costos d'Operació}$$

Equació 7.2. Expressió per al càlcul del Benefici Brut.

$$\text{Benefici Net} = \text{Benefici Brut} - \text{Impostos}$$

Equació 7.3. Expressió per al càlcul del Benefici Net.

Un cop avaluats ambdós tipus de benefici, els paràmetres que se'n deriven directament són el Marge Brut, és a dir, quin percentatge del total dels ingressos esdevé Benefici Brut; el Retorn de la Inversió, és a dir, quin percentatge del total de la inversió esdevé Benefici Net i el Temps de Retorn corresponent als anys en que es pot fer front a la inversió total, tenint en compte el Benefici Net. Les formules de càlcul es mostren en les següents equacions:

$$\text{Marge Brut} (\%) = \frac{\text{Benefici Brut}}{\text{Ingressos}} \cdot 100$$

Equació 7.4. Expressió per al càlcul del Marge Brut.

$$\text{Retorn d'Inversió (\%)} = \frac{\text{Benefici Net}}{\text{Costos d'Inversió}} \cdot 100$$

Equació 7.5. Expressió per al càlcul del Retorn d'Inversió.

$$\text{Temps de Retorn} = \frac{\text{Costos d'Inversió}}{\text{Benefici Net}}$$

Equació 7.6. Expressió per al càlcul del Temps de Retorn.

Existeixen altres paràmetres de rendibilitat més precisos, els quals requereixen el càlcul del flux net de caixa (NCF) del projecte al llarg del seu temps de funcionament. Entre aquests, un dels paràmetres que destaca per la seva sensibilitat és la Taxa Interna de Retorn (TIR), el qual consisteix en l'interès de retorn d'una inversió que iguala els fluxos d'entrada de caixa amb els desemborsaments. El càlcul de la TIR es mostra a l'Equació 7.7 a continuació.

$$\sum_{i=1}^k \frac{NCF_i}{(1 + TIR)^i} - CI = 0$$

Equació 7.7. Expressió per al càlcul de la Taxa Interna de Retorn (TIR) durant el període de funcionament d'un projecte estimat en un nombre de anys k, on: NCF és el flux net de caixa, CI són els costos d'inversió.

Segons el risc que s'hagi d'assumir en una inversió, la TIR varia substancialment, considerant valors acceptables més elevats com més arriscada sigui la inversió. En les inversions realitzades en el camp de la indústria biomèdica o biofarmacèutica no és aconsellable un retorn amb TIRs inferiors al 50%, degut a que es tracta d'una indústria d'elevat risc i en constant evolució. No obstant, aquest factor també depèn molt de la situació concreta on es desenvolupi el procés. Si es tracta d'una planta que es construeix exclusivament per al producte en qüestió, els valors són més conservatius que no pas si el producte s'obté en una planta més versàtil, on se'n produeixin d'altres, de forma que es puguin compartir una sèrie de costos tant d'inversió com d'operació (edificis, comercialització, distribució, etc...) [11].

7.3.4. Comparació de les alternatives

Com s'ha esmentat, a l'apartat 10.2 del capítol d'apèndix es troben els informes econòmics de cadascuna de les diferents alternatives proposades. Per realitzar una anàlisi comparativa dels resultats obtinguts, se n'extreuen els principals indicadors calculats pel simulador i es recullen la Taula 7.8.

A mode de resum, aquesta taula mostra les diferències derivades de la tecnologia i de l'estratègia de producció que predomina en cadascuna de les propostes. D'aquesta manera, començant pel temps de construcció i validació dels projectes, aquelles basades en el bioprocés no convencional el redueixen en un any respecte el convencional (de tres a dos anys), tot accelerant la comercialització del producte.

Paràmetre	Bioprocés convencional		Bioprocés no convencional	
	Discontinu	Perfusió	Discontinu	Perfusió
Temps de vida de la planta (anys)	10	10	10	10
Temps de construcció i validació (anys)	3	3	2	2
Costos d'inversió	Capital Immobilitzat (MM €)	131,8	43,4	62,3
	Capital Circulant (MM €)	14,9	4,0	5,9
Costos d'operació (MM €/any)	100,5	12,8	85,5	17,3
Cost unitari	(€/dosi)	100,50	12,80	85,50
	(€/g)	404.000	51.000	343.000
Capacitat de la planta (Dosis/any)	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000
Preu de venda (€/dosi)	300	300	300	300
Ingressos (MM €/any)	300	300	300	300
Benefici Brut (MM €/any)				
	199,50	287,20	214,50	282,70
Benefici Net (MM €/any)				
	143,60	202,34	152,02	198,26
Marge Brut (%)				
	66,5	95,7	71,5	94,2
Retorn d'Inversió (%)				
	97,8	426,9	222,9	1367,3
Temps de Retorn (anys)				
	1,02	0,23	0,45	0,07
TIR (Taxa Interna de Retorn) (%)				
	115,4	575,8	287,7	1.913,5

Taula 7.8. Resultats econòmics de les simulacions de les diferents alternatives del bioprocés per a l'obtenció de vectors adenovirals.

Pel que fa als costos d'inversió, les alternatives no convencionals sempre resulten comparativament més barates que les seves homòlogues convencionals, a causa de la major facilitat de construcció de la planta i de la reducció d'escala del bioprocés per complir amb les bases de disseny establertes ($1 \cdot 10^{18}$ PV/any), començant pel volum dels bioreactors, la qual cosa també disminueix les necessitats per mantenir la planta plenament operativa durant, per exemple, el mes associat al capital circulant.

Els costos d'operació presenten tendències que difereixen segons l'estratègia de producció. Mentre en les dues alternatives en discontinu segueixen la mateixa tendència del costos d'inversió, degut principalment als elevats costos de les matèries primeres (bàsicament medi de cultiu) que presenta l'alternativa convencional; en el cas de la perfusió, es donen majors costos d'operació en la proposta no convencional, tot i la disminució molt important en els costos d'amortització. Aquest fet es pot explicar en base a l'extraordinari increment de despesa en material fungible de l'etapa de purificació, per fer front al recanvi de les columnes de cromatografia després de finalitzar cada lot (veure apartat 10.2.4 del capítol d'apèndix).

Una anàlisi en més profunditat dels costos d'operació per determinar quines són les partides més importants en cada cas, i sobre les que s'ha d'incidir si es vol optimitzar encara més la despesa, requereix el desglossament percentual de la seva estructura, d'acord amb la Figura 7.14. Com es pot observar, les propostes es distingeixen clarament segons es tracti dels bioprocessos convencionals (veure Figura 7.14a i Figura 7.14b) o no convencionals (veure Figura 7.14c i Figura 7.14d), a causa de la importància de la partida de material fungible en els últims, on aproximadament el seu percentatge triplica el de la següent partida en importància (matèries primeres).

Si es comparen els percentatges de les alternatives convencionals es posa de manifest la importància del cost de les matèries primeres (60,7%) en l'estratègia en discontinu, provocada per les elevades dimensions dels bioreactors principals (veure Figura 7.14a). En operar en continu amb perfusió (veure Figura 7.14b), la reducció del volum del bioreactor principal fa disminuir la partida de matèries primeres, la qual cosa es veu compensada per l'augment del cost de personal i del cost associat a les instal·lacions, corresponent a l'amortització del capital immobilitzat. Per altra banda, malgrat que existeix, aquest fenomen no es fa tan evident entre les dues alternatives no convencionals: la partida de material fungible en l'estratègia en discontinu del 65.33% (veure Figura 7.14c) es veu lleugerament reduïda quan s'opera en continu amb perfusió fins al 57.68% (veure Figura 7.14d), i queda compensada per l'augment de costos de personal i d'instal·lacions. Això es deu al fet que els costos de material fungible (sobretot en la purificació) continuen sent molt més importants que la resta, i emmascaren la petita reducció del 1.51% en les matèries primeres. Per últim, destaca l'ínfima partida de serveis en tots els diagrames, lleugerament superior, en les alternatives convencionals, donat els baixos preus unitaris d'electricitat, vapor i aigua de refrigeració.

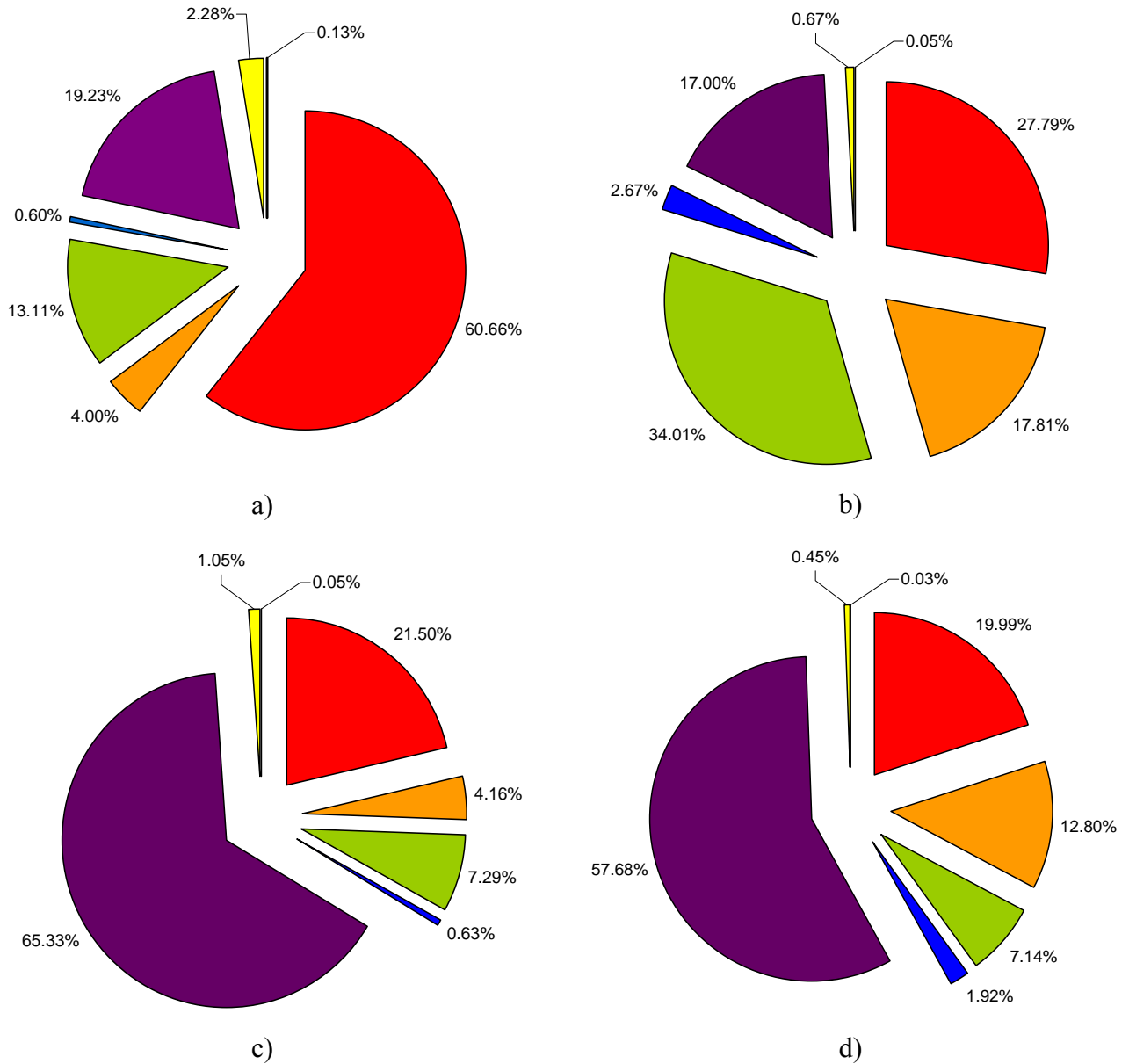


Figura 7.14. Diagrama sectorial de les aportacions percentuals de les diferents partides que conformen els costos d'operació per a cadascuna de les alternatives proposades: a) Bioprocés convencional en discontinu; b) Bioprocés convencional en continu amb perfusió; c) Bioprocés no convencional en discontinu; d) Bioprocés no convencional en continu amb perfusió. La llegenda de colors és comuna a totes les figures: Matèries primeres (■), Personal (■), Instal·lacions (■), Anàlisi i qualitat (■), Material fungible (■), Tractament de residus (■) i Serveis (■).

Els efectes dels costos d'operació també es reflecteixen sobre els costos unitaris, els quals es determinen considerant la capacitat de la planta, fixada en 1.000.000 dosis/any. Així, el cost unitari més baix correspon al del bioprocés convencional operant en perfusió (12,80 €/dosi i 51.000 €/g), seguit pel del bioprocés no convencional operant en perfusió (17,30 €/dosi i 69.000 €/g), excessivament castigat pels costos d'operació de l'etapa de purificació. Independentment d'això, els costos unitaris situen els vectors adenovirals entre els biofàrmacs de més valor afegit, com per exemple el factor VIII (22.000 \$/g [12]) o, en menor mesura, la immunoglobulina G (908 \$/g [6]).

A l'hora de calcular els ingressos estimats, no es considera el sobredimensionament de les diferents alternatives, sinó que la capacitat de la planta és, com s'ha dit, la fixada per les bases de disseny. D'acord amb el preu de venda de 300 €/dosi, comú en tots els casos, els ingressos estimats són de 300 milions d'euros a l'any per a totes les alternatives.

Després de determinar els ingressos, es realitzen els càlculs dels beneficis brut i net que cada proposta origina, la qual cosa condueix a l'estimació dels paràmetres de rendibilitat anteriorment descrits. Observant aquests valors, es conclou que no existeix una única opció amb tots els paràmetres òptims, tot i l'evident major atractiu de les dues alternatives que operen en continu amb perfusió, des d'un punt de vista econòmic. Considerant únicament el Marge Brut, el qual premia els majors ingressos i menors costos d'operació, el bioprocés més rendible és el convencional operant en continu amb perfusió. En canvi, si s'examina la resta de paràmetres, on ja s'inclouen els costos d'inversió, resulta més rendible el seu homòleg no convencional, amb un retorn d'inversió del 1.367,3%, un temps de retorn de 0,07 anys (25 dies) i una TIR molt elevada del 1.913,5%, doncs la planta presenta els costos d'inversió més baixos (14,3 milions d'euros).

Davant d'aquests paràmetres de rendibilitat tan elevats, no cal oblidar que l'anàlisi econòmica es realitza només amb els costos relacionats amb el disseny i operació de la planta. Per fer-la més acurada, caldria afegir els importants costos de desenvolupament del biofàrmac, els quals es desconeixen a priori. Tanmateix, per tenir una idea del seu efecte sobre les alternatives més rendibles que operen en continu amb perfusió, es poden considerar els valors que proporciona l'informe anual de l'associació PhRMA [13]. Segons aquest últim, els costos de desenvolupament es trobarien al voltant de 1.200 milions de dòlars. Suposant que s'amortitzen en el període de vida de la planta (10 anys), els nous paràmetres de rendibilitat calculats es recullen a la Taula 7.9.

Encara que el marge brut no varia per a ambdues alternatives, ja que els ingressos i els costos d'operació continuen sent els mateixos, la resta de valors es redueixen dràsticament respecte els de la Taula 7.8, tot entrant dins d'un rang molt més versemblant. No obstant, cal dir que les conclusions extretes anteriorment no canvien, i el bioprocés no convencional encara resulta lleugerament més rendible, doncs els costos de desenvolupament afecten per igual a totes i cadascuna de les alternatives.

Paràmetre	Perfusió	
	Bioprocés convencional	Bioprocés no convencional
Marge Brut (%)	95.7	94.2
Retorn d'Inversió (%)	26.6	27.1
Temps de Retorn (anys)	3.76	3.69
TIR (%)	11.6	11.9

Taula 7.9. Paràmetres de rendibilitat de les alternatives en continu amb perfusió considerant els costos de desenvolupament.

Una vegada avaluada l'anàlisi de procés de les alternatives a escala d'implantació industrial i conclòs que no existeix un únic model amb tots els paràmetres de rendibilitat òptims, és el moment de decidir quina opció seria més aconsellable d'ésser portada a la pràctica.

Considerant un aspecte tan important per al bioprocés com és l'aplicació final del producte en teràpia gènica per a humans i l'elevat grau de qualitat que d'aquest fet se'n deriva, la tecnologia en la qual es fonamenta la planta i la seva rendibilitat resulten factors definitius a l'hora de prendre aquesta decisió. En aquest sentit, el bioprocés no convencional operant en continu amb perfusió és la millor alternativa. L'únic inconvenient que se'n deriva sorgeix, precisament, de la tecnologia d'un sol ús que el fa ser tan atractiu: els elevats costos d'operació, sobretot en l'etapa de purificació. Aquest fet impulsaria la necessitat de continuar optimitzant el bioprocés en aquesta etapa, com per exemple amb la possible utilització de noves reïnes de cromatografia (reïnes monolítiques), les quals podrien aportar un major rendiment i aconseguir, d'aquesta manera, una possible reducció de la mida dels equips de purificació i dels costos associats.

7.4. Bibliografia

1. Papavasileiou, V., Koulouris, A., Siletti, C. and Petrides, D. 2007. *Optimize manufacturing of pharmaceutical products with process simulation and production scheduling tools*. Chemical Engineering Research and Design 85(7): 1086-1097.
2. Peng, Z. 2005. *Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers*. Human Gene Therapy 16(9): 1016-1027.
3. Xie, L., Metallo, C., Warren, J., Pilbrough, W., Peltier, J., Zhong, T., Pikus, L., Yancy, A., Leung, J., Aunins, J.G. and Zhou, W. 2003. *Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 cell culture under sparging conditions*. Biotechnology and bioengineering 83(1): 45-52.
4. Tang, J.C., Vellekamp, G. and Bondoc, L.L. 2001. *Methods for purifying viruses*. US Patent 2001/0036657.
5. Aziz, A., Kumaresan, S., Foo, D.C.Y. and Tan, J. 2008. *Modelling, optimisation, and debottlenecking of a pharmaceutical production process utilising a batch process simulator*. The Journal of The Institution of Engineers, Malaysia 69(4): 30-37.
6. Harrison, R.G., Todd, P., Rudge, S.R. and Petrides, D.P. 2003. *Bioseparations science and engineering*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press. 426 p.
7. Shahidi, A.J., *Major benefits of single use systems in the biopharmaceutical Industry: An Evolving Technology*, in INTERPHEX. 2008: Philadelphia, PA.
8. Peters, M.S., Timmerhaus, K.D. and West, R.E. 2002. *Plant design and economics for chemical engineers*. 5th ed. London: McGraw-Hill Science/Engineering/Math. 1008 p.
9. Seider, W.D., Seader, J.D. and Lewin, D.R. 2004. *Product and process design principles: synthesis, analysis, and evaluation*. 2nd ed. New York (NY): John Wiley & Sons Inc. 802 p.
10. Hepeng, J. 2007. *Gene dreams troubled by market realities*. Chemistry World 4(9).
11. Lecina, M. 2007. *Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal*. Masters Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès.
12. Shuler, M.L. and Kargi, F. 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. 2nd ed. New York (NY): Prentice Hall PTR. 576 p.
13. PhRMA. 2009. *Pharmaceutical industry profile*. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America.

8. CONCLUSIONS I TREBALL FUTUR

8. CONCLUSIONS I TREBALL FUTUR

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball s'han pogut extreure les següents conclusions finals:

- Tot i els millors paràmetres cinètics que presenta la línia cel·lular productora adherent HEK293 i la potencialitat que ofereix el seu cultiu en pseudosuspensió sobre microsuports, s'han posat de manifest els grans avantatges del cultiu de la línia cel·lular productora no adherent HEK293S, sobretot en previsió de futurs augments d'escala. Aquesta conclusió, justifica l'important esforç invertit en el procés d'adaptació al creixement en suspensió i l'ús de medis específicament definits per facilitar-lo.
- L'estudi del procés d'infecció ha demostrat que es beneficia del sistema de cultiu en suspensió. La homogeneïtat afavoreix el contacte entre els virions i la cèl·lula, i es facilita la penetració dels primers a l'interior del citoplasma cel·lular, la qual cosa es tradueix en una infecció més eficient i productiva.
- En l'etapa de producció, s'ha demostrat la validesa de la mesura de velocitat de consum d'oxigen (OUR) per realitzar el monitoratge en línia de l'activitat cel·lular durant les fases de creixement i d'infecció.
- A partir de l'estudi i aplicació de les principals estratègies de producció, es pot concloure que l'operació en continu amb perfusió és l'alternativa més aconsellable a l'hora d'obtenir les densitats cel·lulars més elevades i metabòlicament molt actives durant la fase de creixement, les quals proporcionen la productivitat específica més alta durant la fase d'infecció.

- L'avaluació dels sistemes de producció (convencional i no convencional) ha posat de manifest la importància d'aquest factor en la producció de vectors adenovirals, juntament amb el monitoratge i l'estratègia de cultiu. En aquest sentit, s'ha confirmat l'eficiència metabòlica addicional de les cèl·lules cultivades en el sistema no convencional *Wave Bioreactor*.

Tanmateix, el disseny dels sistemes d'aeració i d'agitació en aquest bioreactor es tradueix en la impossibilitat d'aplicar la tècnica dinàmica per determinar la velocitat de consum d'oxigen (OUR) en línia. Així doncs, s'aconsella aprofundir en l'estudi i avaluació de noves alternatives per superar aquest problema, com ara les basades en la mesura de la concentració d'oxigen a la fase gas. En aquest sentit, també seria interessant tornar a avaluar mesures com la de pH, eliminades per simplificar el funcionament del bioreactor no convencional.

Finalment, seria molt aconsellable automatitzar el protocol d'addició de nutrients emprat en l'estratègia en continu amb perfusió per facilitar les actuacions, mitjançant la utilització d'un controlador de pes. Juntament amb la possibilitat de disposar de la mesura de OUR (o pH), no només es disposaria de més informació sobre el monitoratge del procés al llarg de tota la producció, sinó que seria possible dissenyar perfils d'addició més eficients, d'acord amb les necessitats immediates de la cèl·lula, tot fent un consum més racional del medi de cultiu.

- Tot i les millores recomanades per al sistema no convencional, la seva utilització es continua considerant molt avantatjosa en aspectes tan importants com la major facilitat de validació i d'adaptació a la normativa GMP. Aquests es recolzen en la simplificació de les etapes de preparació, esterilització (SIP) i neteja (CIP) del bioreactor, la qual cosa també redueix l'equipament auxiliar i facilita molt l'inici de l'operació.
- S'ha dissenyat una estratègia de purificació de vectors adenovirals basada en la cromatografia de bescanvi aniònic, totalment adaptada a afrontar canvis d'escala. En contraposició, es troba l'estratègia no escalable, tradicionalment emprada en l'obtenció de reduïdes quantitats producte, però amb limitacions d'ús degudes a la utilització de la ultracentrifugació.
- Tot i que la possibilitat d'augmentar l'escala es tradueix en un major rendiment global de recuperació del producte final en l'estratègia escalable, s'ha posat de manifest que el grau de puresa aconseguit és inferior a l'obtingut en l'estratègia no escalable, ja que aquesta última permet la recol·lecció específica de la banda de densitat que conté el vector adenoviral més pur.

Així doncs, s'aconsella aprofundir en l'optimització de l'estratègia escalable per millorar el seu factor de concentració i de purificació, en forma de dues propostes que afecten l'etapa de cromatografia. La primera consisteix en substituir l'etapa de cromatografia

d'exclusió molecular per una nova etapa de cromatografia adsortiva; i la segona rau en el recanvi de les reïnes tentaculars emprades en la cromatografia de bescanvi aniònic per reïnes monolítiques d'última generació amb major capacitat per captar les partícules víriques.

Aquestes modificacions proposades tindrien un efecte positiu addicional sobre la resta d'etapes que integren l'estratègia, en forma d'una reducció de les dimensions dels equips emprats o, fins i tot, de la supressió d'alguna d'aquestes etapes (per exemple, etapes de concentració).

- A partir de l'anàlisi de procés de les diferents alternatives generades al llarg del present treball, es pot concloure que els bioprocessos basats en l'estratègia en continu amb perfusió resulten més rendibles econòmicament i més atractius per ésser implantats a escala industrial.

No obstant, aspectes tan importants com, d'un banda, l'aplicació final del producte en el camp de la sanitat humana i l'elevat grau de qualitat requerit que d'aquest fet se'n deriva; i, de l'altra, la reducció del temps global de preparació del bioprocés o l'eliminació de certes operacions de validació (per exemple les de neteja i esterilització), aconsellen la selecció del bioprocés no convencional operant en continu amb perfusió.

L'aplicació d'aquest bioprocés presenta un punt feble important: els seus elevats costos d'operació, sobretot en la purificació. De manera que és necessari aprofundir en la seva optimització de la tecnologia d'un sol ús emprada. En aquest sentit, moltes de les millores anteriorment recomanades ja tindrien una conseqüència final en l'economia del procés i en la reducció no només del costos d'operació, sinó de qualsevol altre tipus. A més, aquest fet influiria molt positivament millorant la competitivitat del bioprocés.

9. MATERIALS I MÈTODES

9. MATERIALS I MÈTODES

9.1. Vector adenoviral

El vector adenoviral emprat en aquest treball és el Ad5-CMV-GFP. Aquest vector de primera generació prové de la modificació genètica de l'adenovirus serotipus 5 (Ad5) per suprimir les regions E1 i E3 del seu genoma. La deleció s'efectua des dels 450 fins als 3.327 parells de bases (E1A, E1B19Kd, E1B55Kd), i des dels 28.249 fins als 30.751 parells de bases (E3-CRI- α 0, E3-gp19Kd, E3-CRI- β 0 (ADP), E3-RID- β , E3-RID- α). A la regió E1 se situa el casset d'expressió amb el gen que codifica per a la proteïna GFP, sota el control del promotor del citomegalovirus humà (CMV).

El vector adenoviral ha estat cedit pel Dr. Miguel Chillón, cap de la Unitat Productora de Vectors (UPV) del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) (Universitat Autònoma de Barcelona).

9.2. Línia cel·lular

9.2.1. Línia cel·lular adherent

La línia cel·lular adherent emprada en aquest treball és la HEK293. Desenvolupada originàriament per Graham i col. [1], prové de la transfecció de cèl·lules de ronyó d'embrió humà (*Human Embryonic Kidney*) amb fragments de DNA de l'adenovirus serotipus 5, la qual cosa fa que expressi constitutivament les proteïnes virals E1A i E1B, necessàries per a la replicació del vector.

Aquesta línia cel·lular ha estat cedida pel Dr. Miguel Chillón, cap de la Unitat Productora de Vectors (UPV) del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) (Universitat Autònoma de Barcelona).

9.2.2. Línia cel·lular no adherent

La línia cel·lular no adherent emprada en aquest treball és la HEK293S, adaptada al creixement en suspensió en medi de cultiu lliure de sèrum.

Aquesta línia cel·lular també ha estat cedida pel Dr. Miguel Chillón, cap de la Unitat Productora de Vectors (UPV) del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) (Universitat Autònoma de Barcelona).

9.3. Medis de cultiu

9.3.1. Medis de cultiu en adherència

El medi que s'utilitza per al cultiu de la línia cel·lular HEK293 és el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen, 31966-021). Aquest medi es comercialitza en format líquid prèviament esterilitzat, i conté les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines i fonts de

carboni imprescindibles per al creixement cel·lular.

La seva composició es detalla a la Taula 9.1.

Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	264	L-Glicina	30
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1	L-Alanil-L-Glutamina	862
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	L-Arginina·HCl	84
KCl	400	L-Cistina·2HCl	63
NaHCO ₃	3700	L-Histidina·HCl·H ₂ O	42
NaCl	6400	L-Isoleucina	105
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	141	L-Leucina	105
VITAMINES		L-Lisina·HCl	146
Colina, clorur	4	L-Metionina	30
D-Àcid pantotènic (sal càlcica)	4	L-Fenilalanina	66
Àcid fòlic	4	L-Serina	42
Nicotinamida	4	L-Treonina	95
Piridoxina·HCl	4	L-Triptòfan	16
Riboflavina	0,4	L-Tirosina	72
Tiamina·HCl	4	L-Valina	94
Inositol	7,2		
ALTRES COMPONENTS			
D-Glucosa (Dextrosa)	4500		
Roig de fenol	15		
Piruvat sòdic	110		

Taula 9.1. Composició (mg/L) del medi de cultiu en adherència DMEM (Invitrogen, 31966-021).

Cal suplementar aquest medi estèril amb els components que s'indiquen a la Taula 9.2.

Component	Solució estoc	Quantitat (Concentració final)
Sèrum Fetal Boví (FBS)	-	100 mL (10% (v/v))
F-68 Pluronic	10% (p/v)	20 mL (0,2% (v/v))
Antiescumejant	1% (p/v)	5 mL (50 ppm)

Taula 9.2. Suplements del medi de cultiu en adherència DMEM. Quantitats per litre de medi.

La preparació de les solucions estoc, a partir de les quals es calculen les quantitats a afegir al medi base, es descriu al següent apartat 9.3.3.

El medi suplementat es manté a 4 °C en absència de llum durant un període no superior a dos mesos.

9.3.2. Medis de cultiu no adherent: medis lliures de sèrum

Degut a les característiques del treball, s'utilitzen dos medis de cultiu diferents per a la proliferació de la línia cel·lular HEK293S. En la Taula 9.3, s'enumeren els mateixos,

especificant el format de venda, l'empresa distribuïdora i el número de catàleg.

Medi de cultiu	Format	Proveïdor	Referència
CD293	Líquid	Invitrogen	11913-019
293 SFMII	Líquid	Invitrogen	11686-029

Taula 9.3. Medis de cultiu no adherent emprats.

A diferència del medi DMEM, les seves composicions es troben protegides sota contracte de confidencialitat i, per tant, no es poden fer públiques. Tanmateix, es troben específicament dissenyats amb la finalitat d'adaptar la línia cel·lular adherent HEK293 al creixement en suspensió i de mantenir cultius d'alta densitat cel·lular.

En aquest cas, cal suplementar ambdós medis amb els components indicats a la Taula 9.4.

Component	Solució estoc	Quantitat (Concentració final)
GlutaMAX	200 mM	20 mL (4 mM)
Antiescumejant	1% (p/v)	5 mL (50 ppm)

Taula 9.4. Suplements dels medis de cultiu no adherent. Quantitats per litre de medi.

Cal observar que no és necessària l'addició del protector cel·lular F-68 Pluronic, ja que aquests medis l'integren en les seves formulacions.

La preparació de les solucions estoc, a partir de les quals es calculen les quantitats a addicionar als medis base, es descriu a l'apartat següent.

9.3.3. Solucions estoc per suplementar els medis de cultiu

Els medis de cultiu emprats se suplementen amb una sèrie de components estèrils, en diferents proporcions segons el medi, a partir d'unes solucions estoc preparades com es descriu a continuació.

9.3.3.1. Sèrum Fetal Boví (FBS)

El sèrum emprat als experiments és subministrat per Invitrogen (10108-165, lot 462115F) en ampolles de 500 mL i s'emmagatzema a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Prèviament a la seva utilització no cal procedir a la inactivació del complement que hi pugui haver en el sèrum, ja que el proveïdor certifica que el producte ha superat un procés d'inactivació tèrmica (incubació a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 30 minuts). Cal recordar que el complement és un conjunt de proteïnes presents a la fracció globulínica del sèrum que actuen com a elements inespecífics del sistema immunològic, i que poden provocar lisi cel·lular. Les proteïnes del complement, a diferència de les immunoglobulines, són termosensibles.

Una vegada es disposa del sèrum, es preparen alíquotes estèrils de 50 mL, les quals es guarden a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.3.3.2. F-68 Pluronic

Es prepara una solució de 25 g de F-68 Pluronic (SigmaAldrich, P1300) en 250 mL d'aigua MilliQ per obtenir una concentració final de 100 g/L (10% (p/v)). Aquesta solució s'autoclava

a 121 °C durant 30 minuts i, posteriorment, es guarda a 4 °C per al seu ús posterior. Habitualment, la proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 20 mL per litre de medi (0,2% (p/v)).

9.3.3.3. Antiescumejant

Es prepara una solució de 3 mL d'antiescumejant Antifoam C 30% (p/v) (SigmaAldrich, A8011) en 90 mL d'aigua MilliQ per obtenir una concentració final de 10 g/L (1% (p/v)). Aquesta solució s'autoclava a 121 °C durant 30 minuts i, posteriorment, es guarda a 4 °C per al seu ús posterior. La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 5 mL per litre de medi (50 ppm).

9.3.3.4. GlutaMAX

El suplement de glutamina GlutaMAX (Invitrogen, 35050-038), emprat als experiments, consisteix en una solució aquosa 200 mM d'un dipèptid format per L-glutamina i L-alanina, el qual evita la degradació de la glutamina i redueix la formació d'amoni durant períodes de temps llargs. La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 20 mL per litre de medi (4 mM).

9.4. Manteniment de la línia cel·lular

9.4.1. Congelació

Cal remarcar que durant el procediment per congelar les línies cel·lulars, s'utilitza com a medi el mateix que s'empra per al seu subcultiu. Aquest s'anomena de forma genèrica Medi X.

Per a la preparació d'un estoc de 10 criotubs (Nunc, 377267) de cèl·lules congelades, el protocol a seguir es mostra a continuació. Cal tenir en compte però, que abans de procedir amb la congelació de la línia cel·lular és important que les cèl·lules es trobin a la meitat de la fase exponencial de creixement i que la viabilitat sigui alta (>90%).

1. Es cultiven cèl·lules en un volum de líquid entre 160 mL i 200 mL (4 flascons amb 50 mL), fins que es trobin al mig de la fase exponencial (aproximadament a les 48 hores de cultiu), ja que la concentració final cel·lular en el criotub haurà de ser de $8 \cdot 10^6$ cèl·lules vives/mL i la concentració a la meitat de la fase exponencial és de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ cèl·lules vives/mL.
2. Es preparen els següents medis de congelació:
 - Medi A: Medi X amb 10% (v/v) FBS (45 mL medi base + 5 mL FBS); es manté a temperatura ambient.
 - Medi B: Medi X amb 10% (v/v) FBS i 20% (v/v) dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma, D-2650) (7 mL medi base + 1 mL FBS + 2 mL DMSO); es manté a 4 °C.
3. Es transfereixen els cultius a congelar (160-200 mL) a tubs de centrifuga de 50 mL estèrils (Orange Scientific, 5540100) i se centrifuguen a 500 G durant 5 minuts.
4. Es descarta el sobrenedant de cada tub, es resuspenen els sediments (pèl·lets) amb un total de 40 mL de medi A, i es determinen la concentració i la viabilitat cel·lulars.

5. A partir de la concentració de cèl·lules vives, es calcula el volum amb què caldria resuspendre les cèl·lules després de centrifugar-les per tal de tenir una concentració final de $8 \cdot 10^6$ cèl·lules vives/mL.
6. Se centrifuguen els 40 mL a 500 G durant 5 minuts.
7. Es descarta el sobrenedant, i es resuspèn el pèl·let amb la meitat del volum calculat anteriorment de medi A. Es manté 10 minuts a 4 °C.
8. S'afegeix l'altra meitat del volum, en aquest cas de medi B (que conté DMSO). El DMSO és un crioprotector que travessa la membrana cel·lular, però és altament tòxic per a la cèl·lula. Per això és important que quan s'afegeixi el medi B les cèl·lules es trobin a 4 °C i que es faci lentament per tal d'evitar un xoc osmòtic.
9. Es transfereix la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta sobre gel (1 mL de la suspensió per criotub), i es posen ràpidament a -80 °C. Cada criotub conté:
 - 0,5 mL de cèl·lules en medi base amb 10% FBS (v/v)
 - 0,5 mL de medi base amb 10% FBS (v/v) i 20% DMSO (v/v)
10. A les 24 hores es transfereixen els criotubs al contenidor de nitrogen líquid (CMR 8031 Cryomed, Forma Scientific).

9.4.2. Descongelació

La descongelació ràpida de les cèl·lules és essencial per a la seva recuperació òptima. El protocol de descongelació consta dels següents passos:

1. Es preparen els següents medis de descongelació:
 - Medi C: 20 mL de medi X amb 20% (v/v) de FBS (16 mL medi X + 4 mL FBS). Es posen 10 mL en 2 tubs de centrífuga de 15 mL estèrils (Orange Scientific, 5540300), i s'escalfen a 37 °C.
 - Medi D: medi X utilitzat normalment pel manteniment de la línia cel·lular.
2. S'agafa el criotub del contenidor de nitrogen líquid, i es posa ràpidament en un bany d'aigua termostàtic a 37 °C. S'agita fins que el contingut estigui pràcticament del tot desglaçat. És important que no es deixi més temps del necessari en el bany, donat que el medi de congelació porta DMSO que és tòxic per a les cèl·lules.
3. Quan el contingut del criotub s'ha descongelat, s'afegeixen unes gotes dels 10 mL de medi C preescalfat a 37 °C, s'homogeneïtza la suspensió cel·lular amb una pipeta estèril, i es transvasa tot el contingut al tub de centrífuga que conté la resta dels 10 mL de medi C.
4. Se centrifuga a 500 G durant 5 minuts, i s'elimina el sobrenedant per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació.
5. Es realitza un segon rentat resuspenent les cèl·lules amb els 10 mL de medi C restants.
6. Es treu una mostra, i es fa un recompte de les cèl·lules vives. Es calcula el volum de medi D que caldrà afegir per tenir una concentració cel·lular de $5 \cdot 10^5$ cèl·lules vives/mL. Se centrifuga el tub a 500 G durant 5 minuts.

7. S'elimina el sobrenedant, i es resuspenen les cèl·lules amb el volum de medi D calculat anteriorment. Es transfereix aquesta suspensió cel·lular a un flascó de cultiu, i es manté a 37 °C dins l'incubador.
8. Normalment, els dos primers dies s'observa una davallada considerable de la viabilitat, aquest fet fa necessari canviar diàriament el medi de cultiu durant aquests dos primers dies per eliminar les restes de DMSO. Per aquest mateix motiu, és important no utilitzar un inòcul inferior a $5 \cdot 10^5$ cèl·lules vives/mL.

9.4.3. Manteniment del cultiu: subcultiu

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es subcultiven successivament en flascons de 25 cm² (TPP, TP90025) durant un període màxim de 3 mesos. L'inòcul utilitzat és de $3 \cdot 10^5$ cèl·lules vives/mL, els cultius es ressemblen cada 3-4 dies, quan les cèl·lules es troben en plena fase exponencial, en 10 mL de medi fresc. D'aquesta manera, novament es proporciona a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaustint (glucosa, glutamina, vitamines, etc...), i s'eliminen els subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (sobretot amoni i lactat). L'objectiu d'aquest subcultiu és disposar sempre de cèl·lules en perfecte estat, a partir de les quals es puguin realitzar els diferents experiments.

El procediment per fer el subcultiu (ressembla) de les línies cel·lulars no adherents i adherents es descriu a continuació.

9.4.3.1. Cultiu no adherent

Aquesta operació es va repetint cada 2-3 dies durant els tres mesos en els que es manté la ressembla de les cèl·lules. La concentració d'inòcul en el cultiu nou és de $3 \cdot 10^5$ cèl·lules vives/mL.

1. Es treu una mostra del flascó de cultiu amb una pipeta, i es realitza un recompte de les cèl·lules vives en suspensió mitjançant un microscopi òptic invertit de contrast de fases (Nikon, TMS-F).
2. Es calcula el volum del cultiu vell que cal centrifugar per obtenir l'inòcul desitjat en el cultiu nou. Aquest càlcul es porta a terme aplicant la següent expressió:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

Equació 9.1. Expressió per al càlcul del volum de ressembla, on: V_1 és el volum de cultiu vell que cal centrifugar, V_2 és el volum de medi X del cultiu nou (10 mL), C_1 és la concentració de cèl·lules vives que s'ha quantificat prèviament en el cultiu vell, C_2 és la concentració de cèl·lules vives en el cultiu nou ($3 \cdot 10^5$ cell/mL).

3. S'afegeixen 10 mL de medi X fresc en el nou flascó de cultiu, i s'incuba a 37 °C per temperar i equilibrar el pH del medi.
4. Se centrifuga el volum del cultiu vell calculat prèviament (V_1) a 500 G durant 5 minuts.
5. S'elimina el sobrenedant, i es resuspenen les cèl·lules amb els 10 mL de medi X fresc que estaven a 37 °C. El nou cultiu s'incuba a 37 °C en una atmosfera al 95% d'humitat i 8% de CO₂.

9.4.3.2. Cultiu adherent

En el cas de les cèl·lules adherents, també se segueix el protocol anteriorment descrit. Primerament, però, és necessari disposar de les cèl·lules en suspensió, tot desancorant-les de la superfície de creixement. La tripsinització és un dels protocols més estesos, ja que la tripsina és un enzim molt efectiu en la degradació de proteïnes d'adhesió.

Aquesta operació es va repetint cada 2-3 dies durant els tres mesos en els que es manté la ressembra de les cèl·lules. En aquest cas, la concentració d'inòcul en el cultiu nou s'expressa en unitats de superfície i és de $4 \cdot 10^4$ cèl·lules vives/cm².

9.4.3.2.1. Tripsinització

A continuació es descriu el protocol per a un flascó de 25 cm² (TPP, TP90025). Tanmateix, els volums emprats han d'ésser convenientment adaptats en funció de l'àrea que disposi cada sistema de cultiu:

1. Es retira el sobrenedant del cultiu.
2. Es renten les cèl·lules amb 10 mL de PBS (Invitrogen, 10010-031).
3. S'afegeix 1 mL de tripsina-EDTA 0,05% (v/v) (Invitrogen, 25300-054), i s'incuba a 37°C durant 3-5 minuts. S'ha d'anar comprovant visualment si les cèl·lules es desenganxen. No es pot allargar aquest pas més del temps necessari per evitar els efectes negatius de la tripsina sobre la membrana cel·lular.
4. Un cop desenganxades les cèl·lules, s'inactiva la tripsina addicionant medi DMEM amb 10% FBS (v/v), en una proporció de 5 - 10 volums de tripsina.
5. S'homogeneïtza, i es continua amb el protocol de subcultiu no adherent.

9.4.4. Control d'esterilitat

Les característiques intrínseques dels cultius de cèl·lules animals, amb velocitats de creixement cel·lular lentes i medis molt rics en nutrients, fan que aquests cultius siguin molt susceptibles a les contaminacions. Per aquest motiu, cal realitzar amb molta cura tots els processos de manipulació i efectuar un control regular de l'esterilitat dels cultius.

La contaminació per bacteris, fongs o llevats es comprova regularment observant els cultius directament al microscopi òptic invertit de contrast de fases (Nikon, TMS), tenyit prèviament amb blau de tripà. A més de poder veure l'organisme contaminant a través del microscopi, també s'observarà com les cèl·lules del cultiu no han crescut o bé s'han mort per la presència del contaminant. També és important realitzar un control regular de l'esterilitat dels medis de cultiu i dels diferents estocs de les solucions emprades per suplementar-les. Per realitzar aquest control, es posen 5 mL del medi o solució que es desitja comprovar en un flascó, i s'incuba a 37 °C durant un o dos dies. Després s'observa directament al microscopi òptic invertit de contrast de fases. És també convenient realitzar aquesta operació sempre que es cregui que hi hagi hagut un procés de manipulació dubtós de qualsevol de les solucions suposadament estèrils utilitzades.

9.5. Producció

9.5.1. Bioreacció: sistemes convencionals

9.5.1.1. Flascons de cultiu

Els flascons de cultiu (*T-Flasks*) emprats estan fabricats en poliestirè, i se subministren prèvia esterilització per radiació. S'utilitzen tres models diferents: els de 25 cm² (TPP, TP90025) per cultivar volums de fins a 10 mL, els de 75 cm² (TPP, TP90075) per a volums de fins a 30 mL i els de 150 cm² (TPP, TP90150) per a volums de fins a 60 mL de medi. La presència d'un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus en el tap dels flascons facilita l'intercanvi de gasos amb l'exterior i permet el control del pH quan el flascó es troba a l'incubador de CO₂, mantenint al mateix temps l'esterilitat.

En aquests flascons, s'han portat a terme experiments preliminars a petita escala i els subcultius de les línies cel·lulars, a partir dels quals es preparen els inòculs per a la resta d'experiments.

9.5.1.2. Flascons de cultiu agitats

Els flascons de cultiu agitats (Techne, *spinner flasks*) són uns recipients de vidre destinats al cultiu cel·lular que assegurin una constant agitació del medi, mitjançant la presència en el seu interior d'una vareta, també de vidre, unida a la base del tap i amb un imant inclòs a l'extrem inferior. En col·locar-los sobre una placa d'agitació magnètica de velocitat regulable amb capacitat simultània per a 4 flascons (Techne, MCS-104S), el pèndol proporciona una agitació suau en sentit circular del medi de cultiu que assegura una homogeneïtzació constant de la suspensió cel·lular, generant un esforç de cisallament (*shear stress*) mínim per a les cèl·lules. L'agitació emprada en tots els experiments és de 60 rpm. Els flascons també disposen a la seva part superior de dues obertures laterals destinades a la presa de mostres i l'intercanvi de gasos.

Els flascons que s'utilitzen per fer créixer cultius tenen uns volums de 125 mL (Techne, F-7987), 250 mL (Techne, F-7690) o 500 mL (Techne, F-7609) de medi.

Tant la placa d'agitació com els flascons agitats es troben dissenyats per poder ser introduïts a l'interior de l'incubador estàtic (Forma Scientific, Incubador IR amb filtre HEPA, model 3862) mantenint-se les condicions de cultiu a 37 °C, en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi, i a un determinat percentatge de CO₂ per controlar el pH en medis de cultiu tamponats.

9.5.1.2.1. Cultiu en adherència: microsuports

Els microsuports aporten la superfície necessària per als cultius en adherència desenvolupats en els flascons agitats. Dues de les alternatives emprades, el Cytodex1 (GE Healthcare, 17-0448-01) i el Cytodex3 (GE Healthcare, 17-0485-01) són microsuports microporosos amb estructura esfèrica; mentre que el Cytopore2 (GE Healthcare, 17-1271-01) és macroporós.

Les seves especificacions tècniques es detallen a la Taula 9.5.

Microsuport	Cytodex1	Cytodex3	Cytopore2
Matriu	Dextrà altament reticulat	Dextrà altament reticulat	Cel·lulosa altament reticulada
Superfície	DEAE	Col·lagen tipus I	DEAE
Diàmetre mitjà (µm)	190	175	200 – 280
Densitat (g/mL)	1,03	1,04	1,03
Àrea (cm²/g)	4.400	2.700	11.000

Taula 9.5. Especificacions tècniques dels diferents microsuports emprats.

9.5.1.2.2. Preparació dels microsuports en flascons agitats

El principal inconvenient per treballar amb microsuports a l'interior de flascons de cultiu agitats és la interacció que es dona entre la superfície del vidre del flascó i els grups carregats presents a la superfície del Cytodex1 i el Cytodex3.

Per aquesta raó és necessari tractar el vidre amb Sigmacote (SigmaAldrich, SL2-100ML), el qual interacciona temporalment amb els grups silanol per generar una fina pel·lícula neutra i hidrofòbica que anul·la temporalment les càrregues del vidre.

A continuació es descriu el protocol de preparació:

1. S'aplica una fina capa de Sigmacote sobre tota la superfície interna del flascó agitat que entra en contacte amb els microsuports. L'excedent es recupera.
2. Es deixa el flascó tota la nit a temperatura ambient perquè s'assequi i, posteriorment, es renta amb abundant aigua destil·lada.
3. Es pesa la quantitat desitjada de microsuports, i es transvasa al flascó agitat. Es resuspèn en 100 mL de PBS.
4. Es protegeixen el filtre i els components de plàstic amb paper d'alumini, i el flascó s'esterilitza per temperatura, a 121 °C durant 30 minuts.

9.5.1.2.3. Protocol d'ancoratge de les cèl·lules en flascons agitats

1. Es retira el PBS dels flascons agitats amb cura per arrossegar la mínima quantitat possible de microsuports.
2. Es prepara l'inòcul, i es resuspèn en un 50% del volum final de cultiu.
3. Es transvasa l'inòcul al flascó i aquest es diposita sobre la placa d'agitació. Durant les primeres 12 hores, es programa la placa magnètica amb períodes intermitents d'agitació de 2 minuts a 20 rpm, seguits de 30 minuts d'aturada. Això afavoreix el contacte entre les cèl·lules i les perles de microsuport.
4. Passades 12 hores, es permet que l'agitació sigui contínua i s'augmenta fins a 60 rpm.
5. Passades 24 hores, s'addiciona el 50% de volum de medi restant (prèviament preescalfat a 37 °C).

9.5.1.3. Bioreactor de tanc agitat: Biostat Bplus

El bioreactor de tanc agitat Biostat Bplus (Sartorius Stedim Biotech) és un equip dissenyat per esdevenir l'estàndard de cultiu, tant cel·lular com microbià, a nivell de desenvolupament i/o producció a escala laboratori.

Com es pot observar a la Figura 9.1, es tracta d'un equip compacte amb una configuració senzilla, els elements principals de la qual són la unitat de mesura i control digital (DCU) i la cuba de fermentació, descrita en apartats posteriors.



Figura 9.1. Bioreactor Biostat Bplus: a l'esquerra, cuba de fermentació amb el motor d'agitació situat a sobre; a la dreta, DCU.

La DCU ofereix totes les funcions necessàries per a l'automatització del procés pel que fa a les variables bàsiques: temperatura, pH i oxigen dissolt (pO_2). Aquestes funcions són l'adquisició de dades, calibratge dels sensors i gestió dels anells de control. Per aquesta raó incorpora una pantalla tàctil que permet a l'usuari consignar i parametritzar els valors de les variables bàsiques, així com mostrar gràficament l'evolució temporal de les mateixes. La DCU també pot ser integrada en un sistema d'automatització jeràrquic via port sèrie RS-232, per així poder modificar els paràmetres de control del procés amb un ordinador de gestió, tal i com es fa en aquest treball.

D'altra banda, disposa de quatre canals independents de gasos d'entrada (aire, N_2 , O_2 , i CO_2), una estació de mescla interna, on es barregen de forma diferent per controlar el pH i la concentració d'oxigen dissolt, i dos de sortida, amb cabalímetres màssics independents en aquests últims.

A continuació, es descriuen breument els anells de control integrats en la DCU:

- Control de temperatura: la temperatura es controla mitjançant un control en cascada amb un màster-controlador per a la temperatura del recipient de cultiu (controlador TEMP) i un servo-controlador per a la temperatura de la camisa de termostatació del recipient (controlador JTEMP). L'element escalfador és una resistència elèctrica interna i el refrigerant aigua de xarxa. El mòdul de control és un PID sense banda morta, i els paràmetres del controlador són: $XP = 20,0\%$, $TI = 300$ s i $TD = 75$ s.
- Control d'agitació: la velocitat d'agitació es regula a través d'un control de motor extern (STIRR). La funció control de la velocitat d'agitació treballa com un controlador de consigna. En el bioreactor, la mescla s'efectua per un agitador amb tres discos de dos pales d'hèlix marina inclinades a 45° i situades equidistants sobre l'eix.

- Control de pH: es realitza pels agents correctors àcids CO₂ gas, injectat a través d'una vàlvula solenoide, i una solució de HCl 0.5 M, addicionada per la bomba peristàltica d'àcid. Com a agent corrector bàsic, es fa servir una solució de NaHCO₃ al 7,5% (p/v), addicionada per la bomba peristàltica de base. Les bombes i la vàlvula es controlen mitjançant sortides de pols ample modulad (pwm) en operació de rang dividit. Això permet que els elements puguin ser controlats simultàniament. El mòdul de control és un PI amb banda morta i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0,5%, XP = 30,0%, TI = 30 s.
- Control d'oxigen dissolt: la concentració d'oxigen dissolt es controla mitjançant la mescla contínua de dos gasos per mitjà de dos cabalímetres màssics que milloren substancialment la qualitat del control. El control de la mescla es realitza gràcies al control en cascada amb el controlador PO₂-GASFLOW, com a master-controlador, i el controlador GASFLOW, com a servo-controlador. El controlador *Gas-Flow Ratio* controla la relació d'entrada de la mescla de gasos (aire/N₂) i en aquest treball s'utilitza com a control del flux el gas total (TOTAL). El mòdul de control sintonitzat per a la membrana tubular de silicona (veure Figura 9.3) és un P amb banda morta, i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0,5% i XP = 1%. Per al difusor de bombolles (veure Figura 9.3) és un PI amb banda morta, i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0,5%, XP = 90% i TI = 50 s.
- Control de nivell: l'augment de nivell en el recipient de cultiu s'evita amb el controlador LEVEL. Aquest controlador funciona com un *On/Off* amb temporització, el qual actua sobre una bomba d'extracció que evita l'ompliment del recipient de cultiu.
- Controlador d'escumes: la presència d'escumes provocades per l'aeració del cultiu s'evita amb el controlador FOAM. Aquest controlador funciona com un *On/Off* amb temporització, el qual actua sobre una bomba d'addició que afegeix antiescumejant (veure apartat 9.3.3.3) al brou de cultiu.

Finalment, la unitat disposa de 4 bombes peristàltiques de velocitat fixa i sentit no reversible (Watson Marlow). Com s'ha esmentat, inicialment estan assignades al control de pH (una bomba per a l'àcid i una per a la base), al control de nivell (LEVEL) i al control d'escumes (FOAM). No obstant, és possible canviar el seu ús, i emprar-les, per exemple, com a actuadors suplementaris en un control d'addició de substrats.

9.5.1.4. Equipament associat al bioreactor

9.5.1.4.1. Cuba

El recipient de cultiu és de vidre (borosilicat) amb una relació alçada/diàmetre de 2:1. El volum màxim de líquid que pot contenir és de 2,5 L, encara que el volum de treball es manté en 2 L. Les juntes tòriques estan fabricades en elastòmer etilènic-propilènic (EPDM) i totes les parts en contacte amb el medi en acer inoxidable, incloent la tapa superior. Aquesta última disposa de 9 entrades de 11 mm de diàmetre, 2 entrades de 19 mm i 3 entrades de 26 mm. Es poden instal·lar la presa de mostra manual, el sistema de bombolleig, el condensador de la sortida de gasos, els diferents sensors, boques injectores, entrada i sortida de gasos, etc...

9.5.1.4.2. Sondes bàsiques

A continuació es descriuen les sondes característiques que s'utilitzen al bioreactor de tanc agitat (veure Figura 9.2).



Figura 9.2. Sondes bàsiques associades al bioreactor de tanc agitat, d'esquerra a dreta: sonda d'oxigen dissolt, sonda de pH, sonda de detecció d'escumes, sonda de nivell i sonda de temperatura.

- La sonda de nivell està basada en el principi de conductivitat, quan el líquid entra en contacte amb el sensor de nivell es tanca el circuit i envia un senyal digital a la funció control LEVEL. És un sensor esterilitzable que no necessita manteniment.
- La sonda de detecció d'escumes segueix el mateix principi de funcionament, però en aquest cas quan l'escuma entra en contacte amb el sensor es tanca el circuit i envia un senyal digital a la funció control FOAM. És un sensor esterilitzable i tampoc no necessita manteniment.
- La sonda de pH consisteix en un elèctrode combinat de vidre (Hamilton, Easyferm Plus K8 200) esterilitzable. El seu rang de mesura oscil·la entre un pH mínim de 2 i un màxim de 12. La superfície de mesura és una petita membrana lateral, que s'ha de mantenir sempre humida, ja sigui submergida en el medi de cultiu, o en l'electròlit corresponent. Aquesta sonda té un temps de vida limitat, i després d'un nombre d'esterilitzacions (entre 10 i 20), s'ha de substituir.
- La sonda de temperatura té la referència PT-100 (Sartorius Stedim Biotech), i el seu aspecte és d'una cànula massissa de metall. És estabilitzable i no precisa de manteniment.
- La sonda d'oxigen dissolt és un elèctrode d'oxigen polarogràfic esterilitzable (Hamilton, Oxyferm FDA 225). La membrana per on s'efectua la mesura està situada en l'extrem inferior del cos de la sonda. Consisteix en una membrana permeable a gasos, de manera que l'electròlit està retingut per la mateixa membrana mantenint en tot moment l'elèctrode submergit. S'ha d'evitar que la membrana es faci malbé o es ratlli; per tant, el seu manteniment consisteix a substituir periòdicament l'electròlit que conté el caputxó protector, quan aquest s'observi danyat o la mesura sigui erràtica.

9.5.1.4.3. Sistema d'aeració

Es disposa de dos sistemes per aportar oxigen al medi de cultiu que es mostren a la Figura 9.3. Cadascun dels sistemes ofereix una velocitat de transferència d'oxigen al medi diferent, però també té diferents característiques pel que fa a l'estrès tallant sobre les cèl·lules.



Figura 9.3. Sistemes d'aeració en el bioreactor de tanc agitat emprats en el treball. D'esquerra a dreta es mostren el difusor d'anell perforat i la membrana tubular de silicona.

A continuació, es descriuen breument algunes de les seves característiques:

- Difusor d'anell perforat (*sparger*): barra d'acer inoxidable amb un anell al seu extrem final amb 14 orificis de 0,5 mm de diàmetre uniformement distribuïts que produeixen bombolles grans. Està situat 15 mm per sota de l'eix d'agitació.
- Membrana tubular de silicona: l'oxigenació per membrana tubular de silicona consta d'un cistell d'acer inoxidable envoltat per 6,3 m de tub de silicona de 3 mm de diàmetre i paret interna de 0,35 mm de gruix que no produeix bombolles en el medi de cultiu, donat que l'oxigen es transfereix per difusió cap al líquid. Està instal·lat al voltant de l'agitador i necessita una pressió de 0,5 bars a la sortida per facilitar la difusió a través seu.

La peculiaritat dels diferents sistemes d'aeració és la presència o no de bombolles i la seva mida. La mida de la bombolla aporta superfície de bescanvi d'oxigen entre fases, essent més efectiu com més petita és la bombolla, però oferint al mateix temps més estrès tallant que pot afectar negativament el cultiu. Per tant, el difusor presenta una capacitat de transferència d'oxigen superior a la membrana de silicona, però com a contrapartida les cèl·lules pateixen més estrès tallant.

Per a cultius cel·lulars, s'utilitza preferiblement la membrana d'aeració en els estadis inicials del cultiu on la demanda d'oxigen és menor. A mesura que augmenta el consum s'utilitza el difusor. Després de cada experiment de cultiu, els difusors es netegen a fons emprant detergent sense fosfats i aigua MilliQ.

9.5.1.4.4. Mòduls de microfiltració

Els mòduls de microfiltració tangencial (*hollow fibers*) estan dissenyats per separar les

cèl·lules animals del medi exhaurit de cultiu durant l'estratègia de producció en perfusió (veure Figura 9.4). Aquests mòduls utilitzen un feix de fibres buides de diàmetre de porus gran per minimitzar l'obturació degut a l'aglomeració cel·lular. Tots els mòduls són esterilitzables per temperatura, a 121 °C durant 30 minuts. Les especificacions tècniques dels diferents mòduls emprats es detallen a la Taula 9.6.



Figura 9.4. Mòduls de microfiltració emprats en el treball. De dalt a baix es mostren els models Cellflo (C22M-011-01N), HFC (CFP-2-E-5A) i Cellflo (C22M-021-01N).

Model	Cellflo C22M-011-01N	HFC CFP-2-E-5A	Cellflo C22M-021-01N
Proveïdor	Spectrum Laboratories	GE Healthcare	Spectrum Laboratories
Material membrana	Esters i cel·lulosa	Polisulfona	Esters i cel·lulosa
Connexions entrada/sortida (in)	¼ hose barb	1/5 Tri-clamp	½ hose barb
Connexions permeat	Luer Lok	½ Nipples	Luer Lok
Diàmetre porus (µm)	0,2	0,2	0,2
Diàmetre intern fibra (mm)	1	1	1
Longitud fibra (cm)	20,8	30	20,8
Area superficial (cm ²)	620	1200	2000
Nombre aproximat fibres	95	127	306

Taula 9.6. Especificacions tècniques dels diferents mòduls de microfiltració emprats.

9.5.1.4.5. Unitats de bombeig

Independentment de les unitats de bombeig incorporades a la DCU, al llarg del treball s'utilitzen diverses unitats de bombeig addicionals. Totes les bombes poden ser utilitzades per bombejar en condicions estèrils quan s'utilitza tub esterilitzable. A continuació, es descriuen breument algunes de les seves característiques:

- Bomba Watson Marlow 101U/R: bomba peristàltica, de velocitat variable i sentit de gir reversible, la qual permet treballar en un ampli rang de cabals baixos de fins a 53 mL/min.

La bomba es connecta a la DCU del bioreactor Biostat Bplus per obtenir un control remot sobre la mateixa. També pot operar manualment.

- Bomba Watson Marlow SciQ 323U/D: bomba peristàltica de velocitat variable i reversible, la qual permet operar amb 6 capçals diferents que cobreixen un ampli rang de cabals. El rang de velocitat del motor va des de 3 fins a 400 rpm. S'ha treballat amb el capçal 313D (Watson Marlow), el qual permet un cabal màxim d'operació de 2 L/min. La bomba opera de forma manual.

9.5.1.5. Equipament per al tractament de dades

9.5.1.5.1. Ordinador de gestió

Es tracta d'un PC (Hewlett Packard, Compaq dc7100), les funcions del qual són el control, monitoratge i supervisió de les variables que descriuen el cultiu cel·lular. Amb aquest equip s'han desenvolupat les receptes de control dels diferents processos.

Especificacions tècniques:

- Pentium 4 a 3,20 GHz.
- Sistema operatiu Windows XP (Microsoft).
- 1 GB de memòria d'accés aleatori (RAM).
- 140 GB de memòria en unitat de disc dur.

9.5.1.5.2. Programari de monitoratge i control

El paquet de software comercial MFCS/win 3.0 (Sartorius Stedim Biotech) es troba específicament dissenyat per al bioreactor Biostat Bplus, i permet el monitoratge i control de totes les variables que descriuen el procés de producció a través de l'ordinador de gestió. D'altra banda, també permet l'emmagatzematge i l'anàlisi posterior de les dades obtingudes.

Es tracta d'un programari amb arquitectura modular client/servidor, el qual compleix amb la norma 21 CFR part 11 de la FDA.

9.5.1.6. Protocols operacionals en el bioreactor convencional

9.5.1.6.1. Operació en discontinu: configuració de la cuba

En l'operació en discontinu, els ports de la tapa d'acer inoxidable del Biostat Bplus es destinen als següents elements:

Ports de 11 mm:

- Sonda de temperatura.
- Sonda de detecció d'escumes.
- Injector d'entrada de nitrogen per capçal.
- Cànula d'entrada d'inòcul
- Cànula de sortida de la presa de mostra.
- Difusor d'anell perforat.
- Suport del cistell de la membrana tubular de silicona.

Ports de 19 mm:

- Sonda de pH.
- Sonda d'oxigen dissolt.

Ports de 26 mm:

- Injector de 4 boques, entrada d'àcid, de base i d'antiescumejant.
- Injector de 2 boques, entrada i sortida de la membrana de silicona.
- Condensador de sortida de gasos per capçal.

9.5.1.6.2. Operació en discontinu: preparació del bioreactor

A la Figura 9.5 es mostra un esquema del muntatge experimental del bioreactor. El protocol de preparació del mateix és el següent:

1. Es munten els diferents components del bioreactor, es revisen i es collen les diverses connexions existents.
2. Es calibren la sonda de pH i les bombes incorporades al bioreactor (àcid, base i antiescumejant).
3. S'omple el bioreactor amb tampó PBS 0,1 M (Invitrogen, 10010-031). També s'omple amb aigua la camisa de termostatació per tal de garantir una bona transferència de calor durant l'esterilització.
4. Es rosquen a la tapa del bioreactor les sondes de temperatura, pH i pO₂. També es preparen tots els filtres i les connexions elèctriques dels cables de les sondes per evitar que es mullin durant l'esterilització (cinta, gomes, cotó, paper d'embolicar i/o paper d'alumini). És important rosca tots els taps menys un, obrir o tancar les pinces necessàries per evitar la pèrdua del PBS degut a la sobrepressió soferta durant l'autoclavat.
5. El muntatge s'autoclava a 121 °C durant 30 minuts.
6. En finalitzar el procés d'autoclavat, es rosca el tap obert i es comprova que totes les connexions, muntatges i filtres romanguin en bon estat.
7. Es connecta l'entrada i sortida d'aigua de la camisa, i s'acaba d'omplir aquesta per evitar la presència d'aire al circuit. Es connecta també l'entrada i sortida d'aigua del condensador, així com les connexions de gasos. Finalment, es connecten els diferents cables de les sondes als seus respectius connectors de la DCU.
8. S'activa el control de temperatura i agitació en les consignes d'operació fins que s'arribi a l'estabilització.
9. S'enceben tots els circuits d'addició d'àcid, de base i d'antiescumejant.
10. Es procedeix a calibrar la sonda de pO₂, la qual s'ha de deixar polaritzant un mínim de 6 hores després de ser esterilitzada. S'ajusta el zero de la lectura d'oxigen mitjançant l'entrada del 100% de nitrogen a través del sistema d'aeració. Posteriorment es deixa entrar únicament aire, i s'ajusta el 100% quan la lectura de la sonda assoleix un valor estable.
11. S'atura el control de temperatura per tal d'evitar el sobreescalfament de l'aigua de la camisa en absència de líquid al bioreactor, i es buida la solució de PBS present a l'interior de la cuba pel circuit d'inoculació.

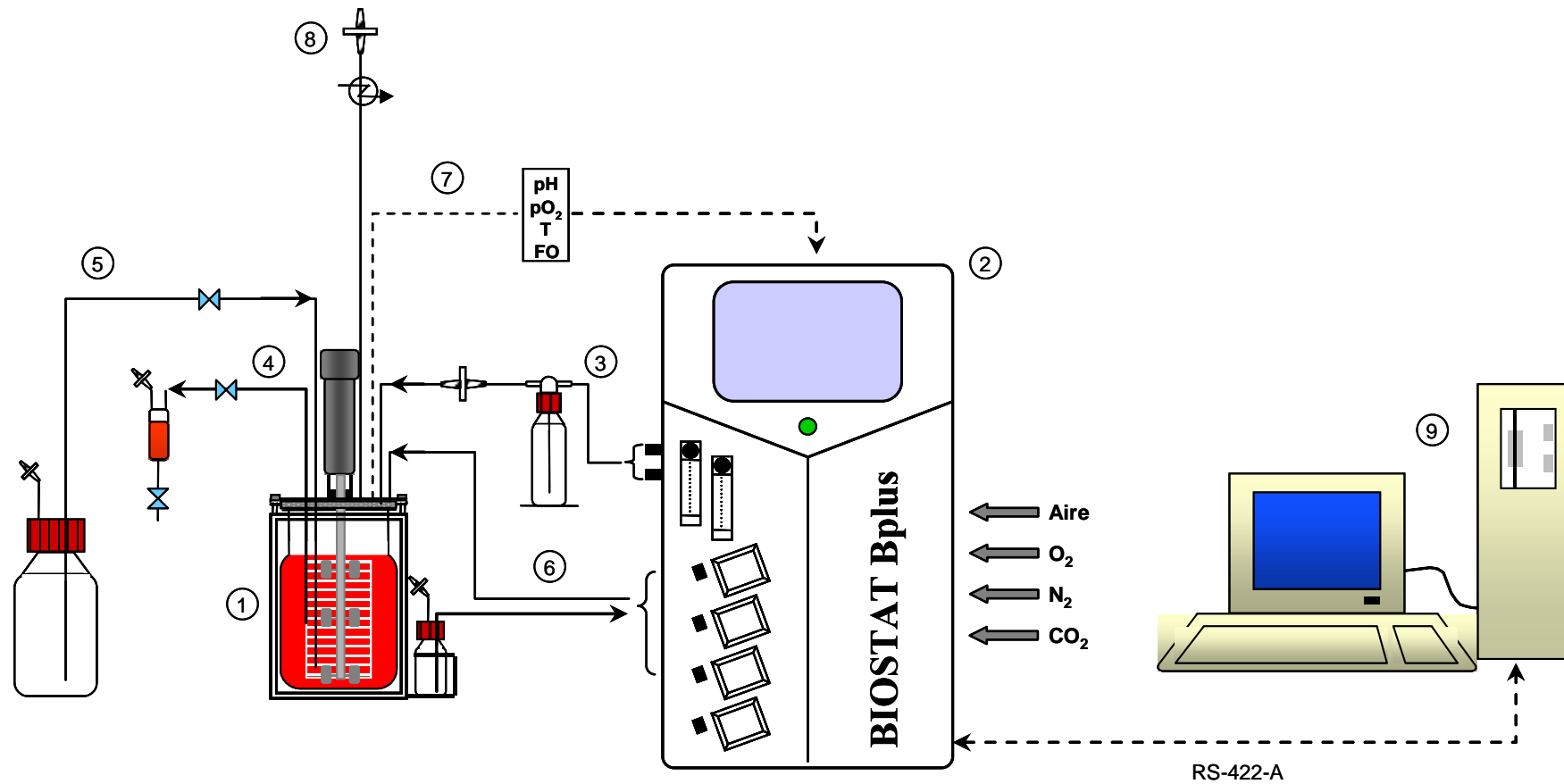


Figura 9.5. Bioreactor de tanc agitat: esquema del muntatge experimental operant en discontinu. 1) Cuba del bioreactor (2 L); 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos; 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 4) Presa de mostra manual; 5) Circuit d'inoculació; 6) Circuit d'addició d'àcid, de base i d'antiescumejant; 7) Sondes de temperatura, pH, pO_2 i de detecció d'escumes; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Ordinador de gestió i control.

12. A la cambra de flux laminar vertical, es canvia l'ampolla plena de PBS per una que conté l'inòcul. Pel mateix circuit per on s'ha buidat el bioreactor, es transvasa estèrilment l'inòcul per desplaçament amb nitrogen gas. L'inòcul s'ha introduït prèviament en una ampolla estèrilment, també a la cambra laminar de flux vertical.
13. S'inicialitzen totes les consignes de control del cultiu. Es deixa que les condicions s'estabilitzin durant una hora abans d'activar la recepta de control i monitoratge del procés, on s'executen les ordres definides, i es mostra l'evolució dels paràmetres més rellevants del cultiu.
14. Entre 1-2 vegades al dia es prenen mostres estèrils del cultiu per realitzar un recompte cel·lular. Després se centrifuguen a 1.700 G durant 5 minuts. Un cop s'ha centrifugat, el sobrenedant es recull en un tub eppendorf i s'emmagatzema a -20°C per poder realitzar posteriorment l'anàlisi del producte, dels substrats i d'altres metabòlits cel·lulars.

9.5.1.6.3. Operació en continu amb perfusió: configuració de la cuba

En l'operació en continu amb perfusió, els ports de la tapa d'acer inoxidable del Biostat Bplus es destinen als següents elements:

Ports de 11 mm:

- Sonda de temperatura.
- Sonda de detecció d'escumes.
- Sonda de nivell.
- Injector d'entrada de nitrogen per capçal.
- Cànula d'entrada del medi recirculat.
- Cànula de sortida del medi recirculat.
- Cànula d'entrada d'inòcul i sortida de la presa de mostra
- Difusor d'anell perforat.
- Suport del cistell de la membrana tubular de silicona.

Ports de 19 mm:

- Sonda de pH.
- Sonda d'oxigen dissolt.

Ports de 26 mm:

- Injector de 4 boques, entrada d'aliment, d'àcid, de base i d'antiescumejant.
- Injector de 2 boques, entrada i sortida de la membrana de silicona.
- Condensador de sortida de gasos per capçal.

9.5.1.6.4. Operació en continu amb perfusió: preparació del circuit de perfusió i del mòdul de microfiltració

Tots els mòduls de microfiltració emprats poden ésser esterilitzats per temperatura, radiació o químicament. En aquest treball s'han autoclavat juntament amb la resta del circuit de perfusió del que formen part. El procediment seguit és el següent:

1. Es calibren prèviament les bombes de retroneteja, d'eliminació del medi exhaurit i de recirculació.
2. S'humiteja amb aigua MilliQ el mòdul de microfiltració.
3. Es munta completament el circuit de perfusió incloent tots els tubs, connectors, ampolles i el mòdul, és a dir, els circuits de recirculació, de retroneteja i d'eliminació del medi exhaurit. Cal no collar gaire les connexions laterals d'entrada del filtre perquè circuli bé el vapor i s'equilibrin les pressions.
4. S'envolten les parts finals del circuit de perfusió (paper d'embolicar i d'alumini), estant segurs de deixar oberts els connectors ràpids (Keck, Quick Disconnect Adapters, H-06841-50 i H-06841-54).
5. S'autoclava el circuit complet de perfusió a 121 °C durant 30 minuts.
6. Es deixa refredar a temperatura ambient, i es collen totes les connexions per assegurar-ne el tancament adequat.
7. Es revisa que totes les connexions tubulars estan collades, i es tanquen els connectors ràpids del final del circuit de perfusió.

Després de cada operació en perfusió, el mòdul emprat es recupera per reutilitzar-lo si és necessari. Seguidament es descriu el protocol de regeneració i el tractament d'un mòdul que ja ha estat utilitzat almenys una vegada:

1. Es renta amb abundant solució aquosa de detergent sense fosfats Triton X-100 0,5% (p/v).
2. Se submergeix tota la nit en una solució aquosa que conté EDTA (Sigma, ED2P) al 1% (p/v) i tripsina (Sigma, T-7409) al 2% (p/v).
3. El cartutx regenerat es renta amb grans quantitats d'aigua MilliQ i, finalment, s'asseca amb nitrogen gas.
4. Finalment, abans de fer servir aquest mòdul en una altra operació en perfusió, es recobreix durant tota la nit amb una solució de polietilenglicol al 1,5% (p/v) (Sigma, P-2139) per reduir l'obturació dels porus, i així perllongar el temps de perfusió.

9.5.1.6.5. Operació en continu amb perfusió: preparació del bioreactor

A la Figura 9.6, es mostra un esquema del muntatge experimental del bioreactor. La preparació del mateix per a cultius en perfusió segueix un protocol molt semblant al descrit a l'apartat 9.5.1.6.2 per a l'operació en discontinu, encara que s'han de tenir en compte els nous elements, com el circuit de perfusió.

Un vegada es disposa del circuit de perfusió autoclavat, es connecta amb la resta del muntatge experimental estèril a l'interior de la cambra de flux laminar vertical amb connectors ràpids. En finalitzar la connexió de tots els nous components, s'adapten els tubs d'entrada i de sortida de medi a les bombes corresponents, i s'uneixen estèrilment al muntatge les ampolles amb el medi fresc.

Durant l'operació, el sistema de control addiciona i extreu medi de forma contínua i automàtica. A mesura que l'operació es perllonga, es reemplaça l'ampolla de medi fresc, quan es troba a punt de quedar buida, i/o la de medi exhaurit, quan es troba a punt de quedar plena.

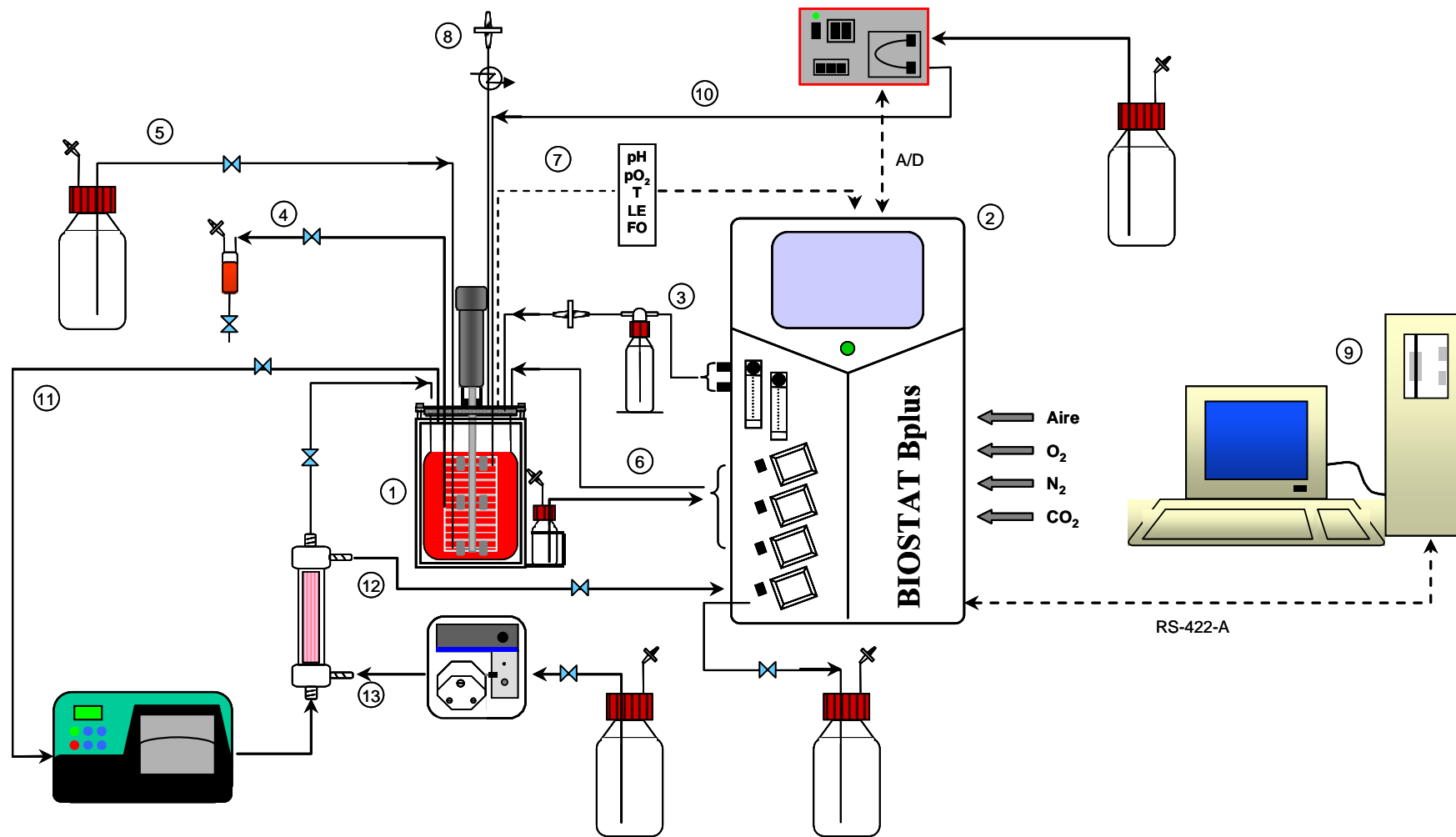


Figura 9.6. Bioreactor de tanc agitat: esquema del muntatge experimental operant en continu amb perfusió. 1) Cuba del bioreactor (2 L); 2) Unitat de control digital (DCU) i estació de mescla de gasos; 3) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 4) Presa de mostra manual; 5) Circuit d'inoculació; 6) Circuit d'addició d'àcid, de base i d'antiescumejant; 7) Sondes de temperatura, pH, pO₂, detecció d'escumes i de nivell; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Ordinador de gestió i control; 10) Circuit d'addició de nutrients; 11) Circuit de recirculació; 12) Circuit d'eliminació de medi exhaurit; 13) Circuit de retroneteja del mòdul de perfusió.

Totes les operacions de canvi de medi es realitzen estèrilment a la cambra de flux laminar vertical.

9.5.2. Bioreacció: sistema no convencional

9.5.2.1. Bioreactor d'un sol ús: *Wave Bioreactor System20/50EHT*

El bioreactor d'un sol ús *Wave Bioreactor System20/50EHT* (GE Healthcare) és l'equip escollit com a sistema no convencional d'un sol ús per portar a terme els experiments. A la Figura 9.7 es mostren els principals components que el configuren.



Figura 9.7. Components del *Wave Bioreactor System20/50EHT*: a) Base i plataforma de cultiu amb la sonda de temperatura incorporada; b) Mòduls de mesura (esquerra) i estacions de mescla de gasos (dreta).

D'una banda, destaquen els elements sobre les quals se situa la cambra de cultiu (veure Figura 9.7a), únic component veritablement d'un sol de tot l'equip, les quals es descriuen a continuació:

- BASE20/50EHT (GE Healthcare, 28-9413-42): és la plataforma d'agitació per balanceig del bioreactor, la qual integra el controlador de velocitat d'agitació i angle, el controlador de temperatura i un senzill compressor per impulsar els gasos d'entrada cap a l'interior de la cambra de cultiu.
- KIT20EHT (GE Healthcare, 28-9416-44): sobre la base s'acobla aquesta peça, la qual consisteix en una plataforma d'acer inoxidable, on es recolza i es fixa la cambra de cultiu. A més, integra la superfície escalfadora i la sonda SRTDX, imprescindibles per realitzar el control de temperatura del bioreactor.

D'altra banda, a aquests components cal incorporar els mòduls de mesura i les estacions de mescla de gasos, descrits a continuació (veure Figura 9.7b):

- DOOPT20 (GE Healthcare, 28-4129-52): és la unitat indicadora de la mesura d'oxigen dissolt procedent de la sonda corresponent, descrita en apartats posteriors. Inclou una pantalla digital que proporciona la lectura contínua a temps real del valor d'aquesta variable a l'interior de la cambra de cultiu

- pH20 (GE Healthcare, 28-4129-53): és la unitat indicadora de la mesura de pH procedent de la sonda corresponent, descrita en apartats posteriors. Inclou una pantalla digital que proporciona la lectura contínua a temps real del valor d'aquesta variable a l'interior de la cambra de cultiu. A diferència de l'indicador DOOPT20, també incorpora la possibilitat d'actuar com a controlador, si es desitja.
- CO2MIX20-R (GE Healthcare, 28-4129-48): consisteix en el mòdul que comprimeix la mescla de gasos d'entrada cap a l'interior de la cambra de cultiu, i controla l'addició de CO₂ en una concentració entre el 0% i el 15% (v/v). El mòdul de control és un PID que actua sobre dos cabalímetres màssics interns. La mescla gasosa enriquida en CO₂ proveeix l'aeració requerida per controlar el pH del cultiu i satisfer les seves necessitats nutricionals, així com per inflar i mantenir inflada la cambra de cultiu.
- O2MIX20-R (GE Healthcare, 28-4129-50): consisteix en el mòdul que comprimeix la mescla de gasos d'entrada cap a l'interior de la cambra de cultiu, i controla l'addició d'oxigen en una concentració entre el 21% i el 50% (v/v). El mòdul de control és un PID que actua sobre dos cabalímetres màssics interns. La mescla gasosa enriquida en oxigen proveeix l'aeració requerida per millorar l'oxigenació del cultiu en cas d'assolir elevades concentracions cel·lulars, així com per inflar i mantenir inflada la cambra de cultiu.

Existeix la possibilitat de formar una xarxa de comunicació incloent tots els elements prèviament descrits via connexió RS-485, a través d'un adaptador RS-232/RS-485, per introduir un ordinador de gestió on es pugin modificar els paràmetres de control del procés, tal i com es fa en aquest treball.

9.5.2.2. Equipament associat al bioreactor

9.5.2.2.1. Cambra de cultiu (*cellbag*)

La cambra o bossa de cultiu (*cellbag*) és pròpiament l'únic element d'un sol ús en el qual es basa el sistema no convencional. Es comercialitza preesterilitzada per radiació, llesta per ésser emprada, i es rebutja una vegada ha finalitzat la seva utilització. Aquest fet elimina les necessitats de neteja i esterilització posteriors a qualsevol bioprocés amb el consegüent estalvi de temps i mà d'obra, a banda de la important reducció del risc de contaminació creuada durant l'operació. El material de fabricació és polietilè de baixa densitat aprovat per la FDA per al tractament de fluids biològics.

Totes les bosses de cultiu emprades disposen d'un volum nominal de 20 L. Tanmateix, el seu rang operacional oscil·la entre 1 L i 10 L, ja que la meitat del volum total s'ha de mantenir ocupat amb una atmosfera de gas en constant renovació.

La Figura 9.8 mostra esquemàticament els elements que incorpora qualsevol cambra de cultiu. Aquests permeten la interacció de l'usuari amb l'interior de la bossa sense comprometre l'esterilitat, i són els següents:

- Filtres de gasos d'entrada i sortida: es tracta de filtres hidrofòbics de 0,1 µm de diàmetre de porus per assegurar l'esterilitat en tot moment de l'interior de la cambra durant el

cultiu. Cal destacar que el filtre de sortida incorpora una vàlvula al seu extrem per mantenir una lleugera sobrepressió a l'interior de la bossa i facilitar la transferència de matèria de la fase gas cap al sí del fluid.

- Port de presa de mostra manual: consisteix en un connector de tipus Luer Lok autosegellant, el qual permet la presa de mostra sense necessitat d'utilitzar cambra de flux laminar. Permet una freqüència de fins a 50 mostres abans de comprometre l'esterilitat del cultiu.
- Circuit d'inoculació: es troba format per un tub flexible amb connector CPC de ¼" a l'extrem. La seva utilització s'ha de realitzar emprant la cambra de flux laminar.
- Circuit de recollida: es troba format per un tub flexible amb connector Luer Lok a l'extrem. La seva utilització s'ha de realitzar emprant la cambra de flux laminar.

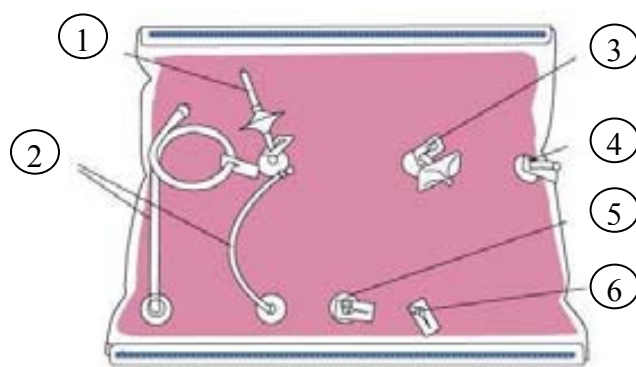


Figura 9.8. Esquema de la cambra de cultiu Cellbag-20L: elements bàsics. 1) Filtre de gasos d'entrada; 2) Circuits d'inoculació i recollida; 3) Filtre de gasos de sortida; 4) Port per a la sonda d'oxigen dissolt; 5) Presa de mostra manual; 6) Port addicional.

La cambra de cultiu disposa de diversos models o configuracions que es diferencien en funció dels elements que incorpora, addicionalment als ja indicats, per proporcionar noves funcionalitats a la bossa. Al llarg d'aquest treball, s'han utilitzat tres alternatives atenent a les necessitats de cada experiment. En la Taula 9.7, s'enumera cadascuna tot esmentant la característica fonamental que la diferencia, l'empresa distribuïdora i el número de catàleg.

Cambra de cultiu	Descripció	Proveïdor	Referència
Cellbag-20L (<i>Oxywell version</i>)	Incorpora el port per a la sonda d'oxigen dissolt	GE Healthcare	CB0020L10-02
Cellbag-20L (<i>pH version</i>)	Incorpora la sonda de pH	GE Healthcare	CB0020L10-05
Cellbag-20L (<i>Perfusion version</i>)	Incorpora el filtre de perfusió intern (diàmetre porus 0,7 µm)	GE Healthcare	CB0020L10-04

Taula 9.7. Cambres de cultiu (*celbags*) emprades.

9.5.2.2.2. Escalfador del filtre de gasos de sortida

L'escalfador (GE Healthcare, 28-4116-41) és una funda de goma dissenyada per adaptar-se al filtre de gasos de sortida de la cambra de cultiu (veure Figura 9.9). Actua com una manta calefactora que assoleix una temperatura entre 50 i 65 °C, la qual cosa evita la condensació d'humitat i posterior colmatació del filtre, degut al refredament sobtat que pateix la temperatura del gas de sortida en passar de l'interior de la bossa a l'exterior, quan el bioreactor opera fora de l'incubador.

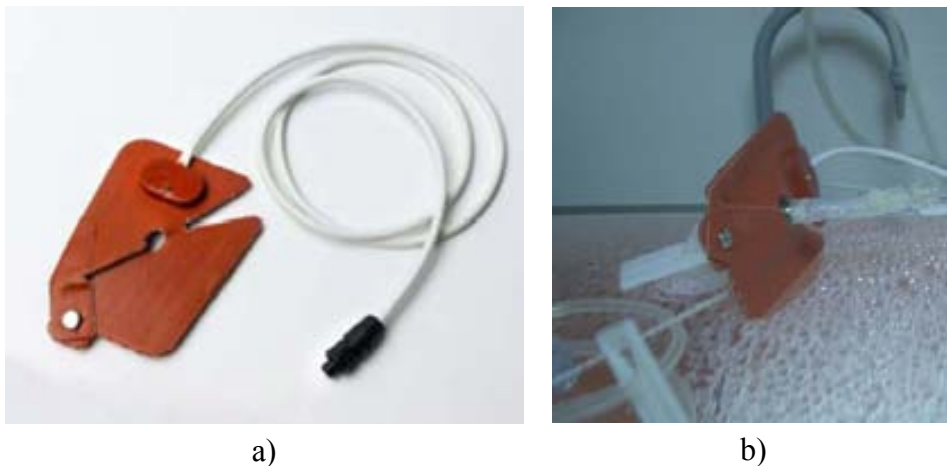


Figura 9.9. Equipament associat al bioreactor d'un sol ús: a) Escalfador del filtre de gasos de sortida; b) Detall de funcionament.

9.5.2.2.3. Sondes bàsiques

A continuació es descriuen les sondes característiques que acompanyen la bioreactor d'un sol ús (veure Figura 9.10).

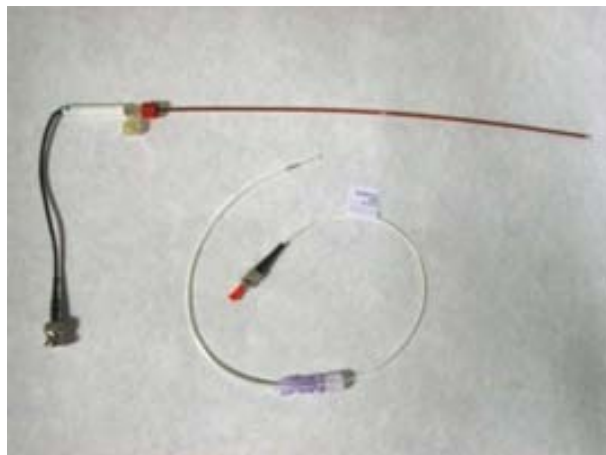


Figura 9.10. Sondes bàsiques associades al bioreactor d'un sol ús: a la part superior sonda de pH; a la part inferior sonda d'oxigen dissolt.

- La sonda de pH (GE Healthcare 28-4116-71) correspon a un elèctrode combinat miniaturitzat. El seu rang de mesura oscil·la entre un pH mínim de 4 i un màxim de 10. La sonda s'obté preesterilitzada per radiació, i s'ha d'inserir en un dels ports de la cambra de cultiu, utilitzant la cambra de flux laminar vertical, o bé ja es troba preinstal·lada a la

bossa. Pot ésser reutilitzada, però mai després d'un procés d'esterilització per temperatura, que no suportaria.

- La sonda d'oxigen dissolt (GE Healthcare, 28-4116-72) és un element de mesura òptic miniaturitzat en forma de fibra. La concentració d'oxigen és proporcional a la intensitat lumínica que emet un pegat sensible a la concentració d'oxigen, immobilitzat a l'extrem de la fibra. No requereix de cap tipus d'esterilització, ja que només s'utilitza en aquelles cambres de cultiu, com la Cellbag-20L (*Oxywell version*), que incorporen un port permeable als gasos específicament dissenyat per encabir-la.

9.5.2.2.4. Unitats de bombeig

A continuació, es descriuen breument algunes de les característiques de les unitats de bombeig emprades amb el bioreactor d'un sol ús:

- Bomba Watson Marlow SciQ 323U/D: bomba peristàltica de velocitat variable i reversible permet operar amb 6 capçals diferents que cobreixen un ampli rang de cabals. El rang de velocitat del motor va des de 3 fins a 400 rpm. S'ha treballat amb el capçal 313D (Watson Marlow), el qual permet un cabal màxim d'operació de 2 L/min. La bomba opera de forma manual.
- Bomba Masterflex L/S 7521-45: La bomba peristàltica Masterflex (Cole Palmer) de velocitat variable i reversible permet operar amb 4 capçals diferents que cobreixen un ampli rang de cabals. El rang de velocitat del motor va des de 6 fins a 600 rpm. S'ha treballat amb el capçal Easy-Load 7518-00 (Cole Palmer), el qual permet un cabal màxim d'operació de 2,3 L/min. La bomba opera de forma manual.

9.5.2.3. Equipament per al tractament de dades

9.5.2.3.1. Ordinador de gestió

Es tracta del mateix ordinador descrit a l'apartat 9.5.1.5.1.

9.5.2.3.2. Programari de monitoratge i control

El paquet de software comercial PCDAQ (GE Healthcare) es troba específicament dissenyat per al *Wave Bioreactor*. Permet el control i el monitoratge en temps real de totes les variables que descriuen el procés de producció a través de l'ordinador de gestió. D'altra banda, també permet l'emmagatzematge i anàlisi de les dades obtingudes.

9.5.2.4. Protocols operacionals en el bioreactor no convencional

9.5.2.4.1. Operació en discontinu: preparació del bioreactor

A la Figura 9.11 es mostra un esquema del muntatge experimental del bioreactor. El protocol de preparació emprat amb les bosses de cultiu Cellbag-20L (*Oxywell version*) i Cellbag-20L (*pH version*) és el següent:

1. Es prepara la bossa de cultiu per a la seva utilització, tot fixant-la sobre la plataforma d'agitació. Posteriorment, es connecta l'entrada de gasos i s'ajusta l'escalfador del filtre de gasos de sortida.

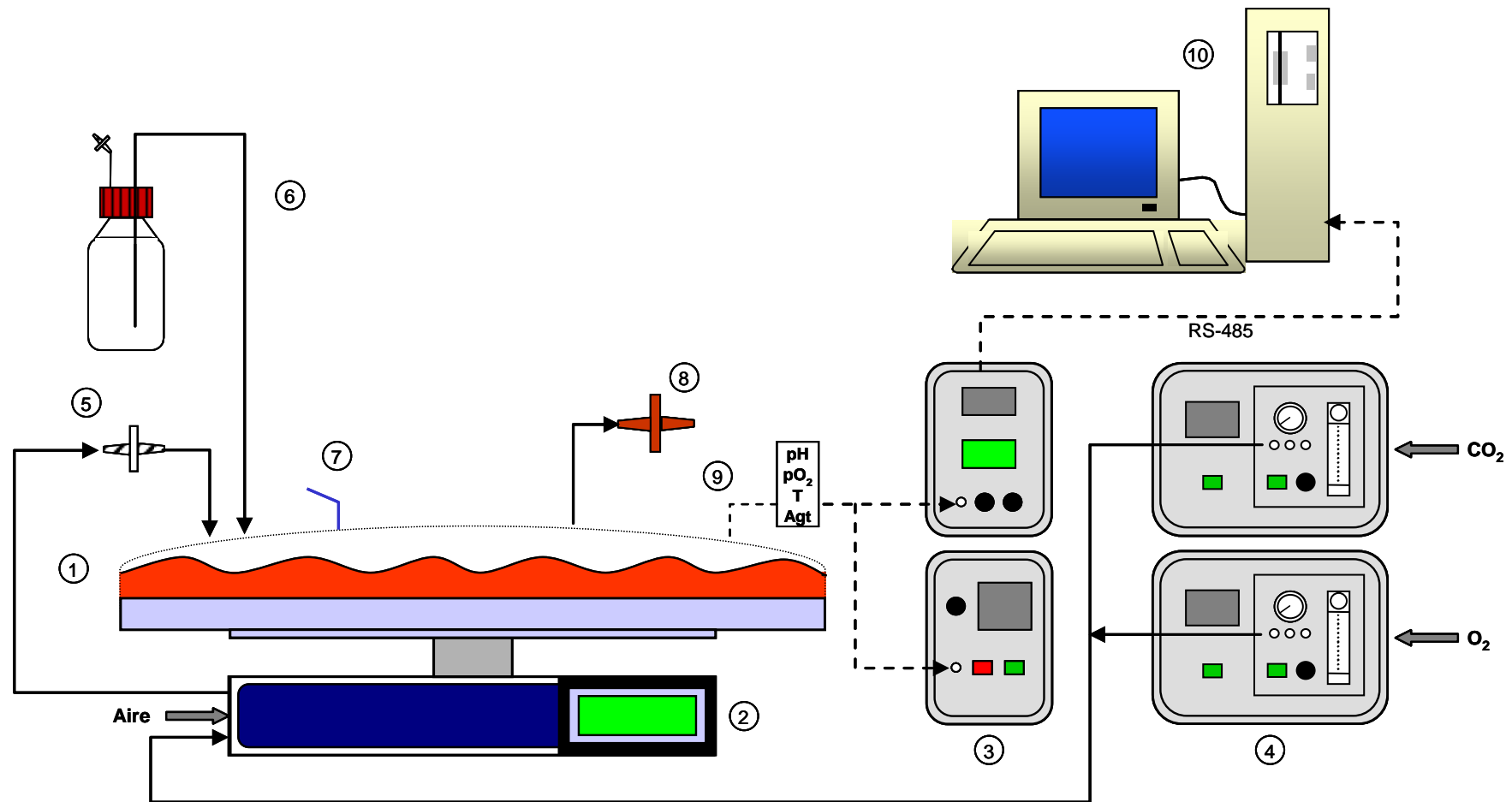


Figura 9.11. Bioreactor d'un sol ús: esquema del muntatge experimental operant en discontinu. 1) Cambra de cultiu (10 L); 2) Plataforma d'agitació per balanceig; 3) Unitats de mesura de pH i pO₂; 4) Estacions de mescla de gasos; 5) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 6) Circuit d'inoculació; 7) Presa de mostra manual; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Sondes de temperatura, pH i pO₂; 10) Ordinador de gestió i control.

2. S'activa el compressor de gasos i la bossa de cultiu s'infla lentament amb la mescla gasosa adient, mentrestant es connecten els diferents cables de les sondes a les seves respectives unitats de mesura i/o control. En finalitzar el procés d'inflat, es verifica que la rigidesa de la bossa de cultiu sigui correcta amb una lleugera pressió.
3. A la cambra de flux laminar vertical, es connecta el circuit d'inoculació de la bossa al contenidor de medi de cultiu. S'introdueixen 4 L de medi estèrilment en el bioreactor per desplaçament amb nitrogen gas, mantenint la bossa inflada en tot moment. Posteriorment, s'activen els controls de temperatura i d'agitació.
4. Mentre s'estabilitzen les condicions al bioreactor, es procedeix a calibrar externament la sonda d'oxigen DOOPT20. Està absolutament prohibit tocar el seu extrem en cap moment. S'ajusta el 0% en la lectura de la sonda mitjançant la seva introducció en la solució ZERO OXYSOLN subministrada amb la sonda. Posteriorment es neteja amb aigua destil·lada, es deixa a l'ambient fins que la lectura sigui estable i s'ajusta el senyal del 100%.
5. S'instal·la la sonda en el port corresponent de la cambra de cultiu i es comprova si cal recalibrar-la. En els experiments on existeix mesura de pH, la sonda ja es troba prèviament instal·lada a la cambra de cultiu, de manera que només cal comprovar si cal recalibrar-la amb la mesura que proporciona el medi.
6. Quan les condicions del bioreactor són estables, es prepara l'inòcul en 1 L de medi de cultiu, i s'introdueix estèrilment en una ampolla. Aquesta es connecta al circuit d'inoculació, i s'introdueix en el bioreactor per desplaçament amb nitrogen gas.
7. S'inicialitzen totes les consignes de control del cultiu. Es deixa que les condicions es tornin a estabilitzar per tal d'executar el programari de control i monitoratge del procés, on s'executen ordres definides i es mostra l'evolució dels paràmetres més rellevants del cultiu.
8. Entre 1-2 vegades al dia es prenen mostres estèrils del cultiu per realitzar un recompte cel·lular. Després se centrifuguen a 1.700 G durant 5 minuts. Un cop s'ha centrifugat, el sobrenedant es recull en un tub eppendorf i s'emmagatzema a -20°C per poder realitzar posteriorment l'anàlisi del producte, dels substrats i d'altres metabòlits cel·lulars.

9.5.2.4.2. Operació en continu amb perfusió: preparació del bioreactor

Donat que el protocol operacional en continu amb perfusió es porta a terme amb les bosses de cultiu Cellbag-20L (*Perfusion version*) amb filtre de perfusió intern, la preparació del *Wave Bioreactor* en aquest cas segueix un protocol idèntic al descrit a l'apartat anterior.

Durant l'operació, la perfusió es realitza de forma semicontínua. Per tant, s'activen alternativament i per aquest ordre, la bomba d'extracció de medi exhaurit a través del filtre i, posteriorment, la d'addició de medi fresc per tal de mantenir constant el volum i el nivell de nutrients a l'interior del bioreactor. A mesura que l'operació es perllonga, es reemplaça l'ampolla de medi fresc, quan aquesta es troba a punt de quedar buida, i/o la de medi exhaurit, quan es troba a punt de quedar plena. Totes les operacions de canvi de medi es realitzen estèrilment a la cambra de flux laminar vertical.

A la Figura 9.12 es mostra un esquema del muntatge experimental del bioreactor.

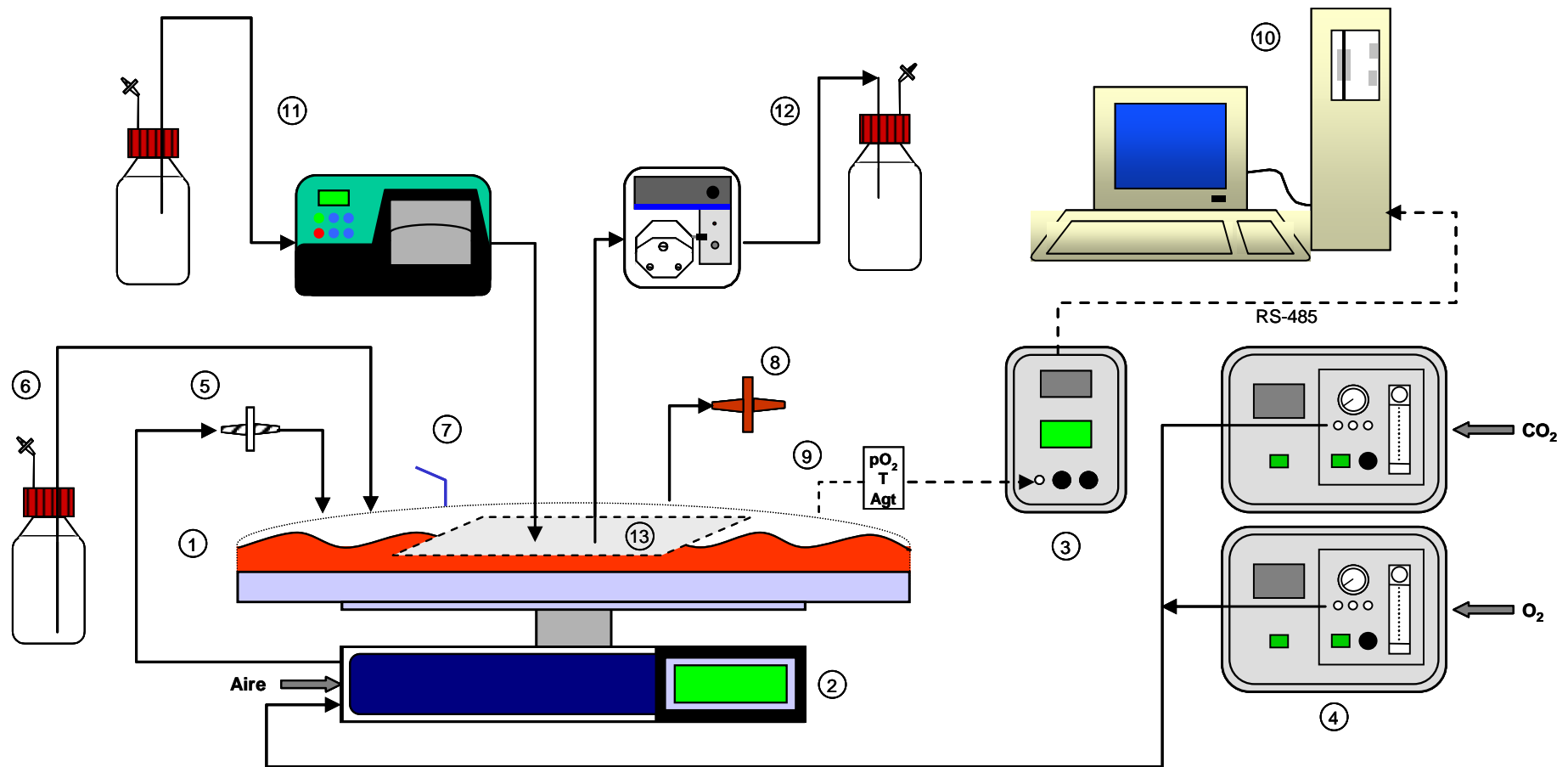


Figura 9.12. Bioreactor d'un sol ús: esquema del muntatge experimental operant en continu amb perfusió. 1) Cambra de cultiu (10 L); 2) Plataforma d'agitació per balanceig; 3) Unitat de mesura de pO₂; 4) Estacions de mescla de gasos; 5) Circuit d'entrada de la mescla de gasos; 6) Circuit d'inoculació; 7) Presa de mostra manual; 8) Circuit de sortida de la mescla de gasos; 9) Sondes de temperatura i pO₂; 10) Ordinador de gestió i control; 11) Circuit d'addició de nutrients; 12) Circuit d'eliminació de medi exhaurit; 13) Filtre de perfusió intern.

9.6. Purificació

9.6.1. Microfiltració

La microfiltració constitueix, juntament amb la centrifugació, un dels processos que conforma l'etapa de clarificació del procés de purificació.

9.6.1.1. Mòdul de microfiltració

El filtre plegat ULTA Cap PP (GE Healthcare, KPP-A-9602GG) està dissenyat per separar els sòlids continguts en el sobrenedant mitjançant el mode d'operació en flux normal (veure Figura 9.13). Pot suportar repetidament processos d'esterilització per temperatura fins a 135°C.

A continuació s'indiquen les especificacions tècniques principals:



Figura 9.13. Càpsula de microfiltració.

- Connexions entrada/sortida: 6 mm stepped hose barb
- Material de membrana: polipropilè (PP)
- Gruix: 51 mm
- Àrea: 400 cm²
- Diàmetre de porus: 0,6 µm

9.6.1.2. Unitat de bombeig

La bomba Masterflex L/S 77920-30 (Cole Palmer) de velocitat variable i reversible permet operar amb 4 capçals diferents que cobreixen un ampli rang de cabals. El rang de velocitat del motor va des de 10 fins a 600 rpm. S'ha treballat amb el capçal Easy-Load II 77200-62 (Cole Palmer). La bomba opera de forma manual.

9.6.1.3. Protocol operacional

1. Es munten els components del sistema de microfiltració dins de la cambra de flux laminar vertical. S'afegeix un manòmetre diferencial abans del filtre per conèixer en tot moment la pressió d'entrada durant l'operació.
2. Es pesa el sobrenedant inicial amb una balança compacta (Ohaus, CS5000) per facilitar la mesura del volum inicial, i es pren una alíquota en tub eppendorf per a posteriors anàlisis.
3. Es neteja el filtre plegat ULTA Cap PP (GE Healthcare) amb 500 mL d'aigua MilliQ.
4. S'alimenta el sobrenedant inicial al sistema, i es filtra a flux constant en ampolles estèrils (Millipore, SC00B10RE). Inicialment s'opera amb un cabal de 10 mL/min i gradualment s'incrementa fins a 50 mL/min, a mesura que el flux de filtrat disminueix, degut a l'increment de la pressió d'entrada.

5. En finalitzar l'operació, es pesa el filtrat final amb una balança compacta (Ohaus, CS5000) per facilitar la mesura del volum final, i es pren una alíquota en tub eppendorf per a posteriors anàlisis.
6. Es guarda el filtrat a 4 °C fins a l'inici de la pròxima etapa de purificació, en un breu període de temps, o bé s'emmagatzema a -80 °C.

9.6.2. Ultrafiltració / Diafiltració

La ultrafiltració i la diafiltració constitueixen les operacions que conformen les etapes de concentració i condicionament, respectivament, del procés de purificació.

9.6.2.1. Midjet Advanced

El sistema Midjet Advanced (GE Healthcare, MDG-4SP) permet la concentració i/o diafiltració de solucions biològiques a escala de laboratori dins d'un rang operacional que oscil·la entre els 5 mL i els 200 mL de volum. El sistema es troba dissenyat específicament per utilitzar els mòduls d'ultrafiltració tangencial de fibres buides tipus MidGee (GE Healthcare), la tecnologia dels quals millora el rendiment de l'operació i proporciona resultats que faciliten el canvi d'escala.

Tal i com es pot observar a la Figura 9.14, a banda del mòdul d'ultrafiltració, la unitat inclou diversos components entre els quals destaquen: els tancs d'aliment/concentrat i de filtrat, la bomba peristàltica de recirculació de velocitat constant, la vàlvula de pinçament per ajustar la pressió de sortida (*backpressure valve*), els sensors de pressió d'entrada/sortida del filtre i la base de l'equip, la qual inclou els indicadors digitals de temperatura i de la pressió d'entrada, de sortida i de filtrat.

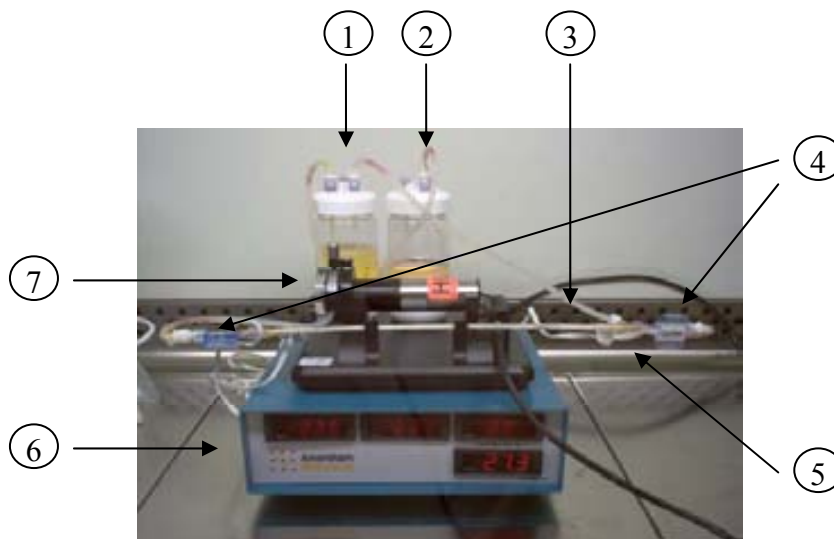


Figura 9.14. Sistema d'ultrafiltració/diafiltració Midjet Advanced (GE Healthcare). Components principals: 1) Tanc d'aliment/concentrat; 2) Tanc de filtrat; 3) Mòdul tangencial de filtració; 4) Sensors de pressió d'entrada i sortida del mòdul; 5) Vàlvula d'ajust de la pressió (*backpressure valve*); 6) Base i indicadors digitals; 7) Bomba peristàltica de recirculació.

9.6.2.2. Quixstand

El sistema Quixstand (GE Healthcare, KCQSM03SP) és un equip compacte de concentració i/o diafiltració a escala de laboratori i pilot, el rang d'operació del qual oscil·la entre els 200 mL i els 2 L d'aliment. El seu component principal és el mòdul d'ultrafiltració de fibres buides tipus Xampler (GE Healthcare), la tecnologia del qual permet la concentració i/o diafiltració d'un ampli espectre de solucions biològiques de forma eficient.

A banda d'aquest element, la resta de components principals que configuren l'equip també es mostren a la Figura 9.15: els manòmetres per mesurar la pressió d'entrada i de sortida del mòdul de filtració, la vàlvula de pinçament per ajustar la pressió de sortida (*backpressure valve*), el tanc d'aliment/concentrat, la vàlvula de drenatge del tanc (*drain valve*) i el suport que inclou la bomba peristàltica de recirculació 323S (Watson Malow). El rang de velocitat de la bomba oscil·la des de 3 rpm fins a 400 rpm. S'ha treballat amb el capçal 313D (Watson Marlow), el qual permet un cabal màxim d'operació de 2 L/min. La bomba opera de forma manual.

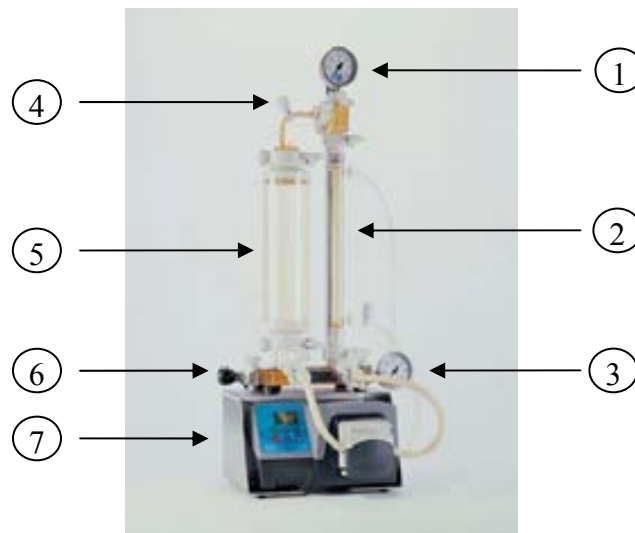


Figura 9.15. Sistema d'ultrafiltració/diafiltració Quixstand (GE Healthcare). Components principals: 1) Manòmetre indicador de la pressió de sortida; 2) Mòdul tangencial de filtració; 3) Manòmetre indicador de la pressió d'entrada; 4) Vàlvula d'ajust de la pressió (*backpressure valve*); 5) Tanc d'aliment /concentrat; 6) Vàlvula de drenatge (*drain valve*); 7) Bomba peristàltica de recirculació.

9.6.2.3. Equipament associat

9.6.2.3.1. Mòduls d'ultrafiltració

Els mòduls d'ultrafiltració tangencial, emprats en ambdós sistemes, utilitzen un feix de fibres buides de reduït diàmetre de porus per optimitzar la separació de substàncies de baix pes molecular. Tots són esterilitzables per temperatura, a 121 °C durant 30 minuts.

Les seves especificacions tècniques es detallen a la Taula 9.8.

Equip	Midjet Advanced	Quixstand
Model	MidGee UFP-100-E-MM06A	Xampler UFP-100-E-3MA
Proveïdor	GE Healthcare	GE Healthcare
Material membrana	Polisulfona	Polisulfona
Connexions entrada/sortida (in)	Luer Lok mascle	½ Tri-Clamp
Connexions permeat	Luer Lok mascle	1/4 Nipples
Diàmetre porus (NMWC)	100.000	100.000
Diàmetre intern fibra (mm)	1	1
Longitud fibra (cm)	30	30
Area superficial (cm²)	16	110
Nombre aproximat fibres	2	11

Taula 9.8. Especificacions tècniques dels diferents mòduls d'ultrafiltració emprats.

9.6.2.4. Protocol operacional

1. Previ a l'inici de la ultrafiltració, es manté el mòdul submergit durant una nit en una solució aquosa d'etanol al 25% (v/v).
2. Es munten els components del sistema dins de la cambra de flux laminar vertical, i s'instal·la el mòdul.
3. Es neteja el mòdul amb 500 mL aigua MilliQ.
4. Es pesa el sobrenedant inicial amb una balança compacta (Ohaus, CS5000) per facilitar la mesura del volum inicial, i es pren una alíquota en tub eppendorf per a posteriors anàlisis.
5. S'alimenta el sobrenedant inicial al sistema
6. Es determinen les condicions d'operació: s'activa la bomba de recirculació a 400 rpm i, amb la vàlvula per ajustar la pressió de sortida lleugerament tancada, es mesuren les pressió d'entrada i de sortida del mòdul i el flux de filtrat; la vàlvula es tanca i es repeteixen les mesures. Les condicions d'operació es fixen en el moment en què es doni una estabilització en el flux de filtrat encara que es tanqui més la vàlvula de pinçament, degut al fenomen de polarització per concentració que té lloc a la superfície de la membrana.
7. S'ultrafiltra fins que s'assoleix el volum de retintut desitjat, el qual es coneix prèviament en funció del factor de concentració prefixat.
8. En finalitzar l'operació, es pesa el retintut final amb una balança compacta (Ohaus, CS5000) per facilitar la mesura del volum final, i es pren una alíquota en tub eppendorf per a posteriors anàlisis.
9. Finalment, es guarda el retintut a 4 °C fins a l'inici de la pròxima etapa de purificació, en un breu període de temps, o bé s'emmagatzema a -80 °C.

El protocol de diafiltració és idèntic a l'anterior, únicament es diferencia en haver de diluir inicialment l'aliment amb la solució tampó i en la repetició del protocol d'ultrafiltració tres vegades.

9.6.3. Tractament d'àcids nucleics

El tractament d'àcids nucleics es realitza mitjançant la digestió enzimàtica amb benzonasa. La benzonasa és una endonucleasa amb una elevada capacitat per degradar DNA i RNA, amb diferents formes (cadena doble o senzilla, amb forma lineal o circular) fins a oligonucleòtids aproximadament de 3 a 8 parells de bases. Per presentar la seva conformació activa requereix la presència del catió Mg^{2+} com a cofactor.

La benzonasa (Merck KgaA, 101695) es comercialitza en solució amb 100.000 unitats d'activitat (UA).

9.6.3.1. Protocol operacional

1. Es prepara la solució tampó d'activació: 100 mM de Tris, 100 mM de $MgCl_2$ en aigua MilliQ. S'ajusta el pH a 8 unitats, i s'emmagatzema la solució a 4 °C.
2. Es preparen alíquotes de benzonasa de 10.000 UA/mL per dilució de la solució inicial en un volum final de 100 μ L en solució tampó d'activació.
3. Es tracta la mostra amb una concentració de 100 UA/mL de benzonasa aproximadament durant 1 h amb lleugera agitació manual de forma intermitent, sempre a temperatura ambient. Per aprofitar els equips d'ultra/diafiltració descrits en apartats anteriors, és possible realitzar l'etapa de tractament d'àcids nucleics en el mateix tanc d'aliment que conté el concentrat, un cop es finalitza la ultra/diafiltració.

9.6.4. Cromatografia

9.6.4.1. Cromatògraf FPLC

El sistema de cromatografia líquida a baixa pressió ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare) és un equip totalment automatitzat i dissenyat pel desenvolupament de processos de purificació en aplicacions de recerca. Com es pot observar a la Figura 9.16, es tracta d'una unitat integrada per quatre mòduls principals superposats.



Figura 9.16. Sistema de cromatografia líquida FPLC, ÄKTAexplorer 100. De baix a dalt es mostren els mòduls P-900, UV-900, pH/C-900 i BOX-900.

A continuació, es descriuen breument els quatre mòduls de baix a dalt.

- P-900: es tracta d'una bomba de pistó de 4 capçals, el disseny de la qual permet la generació de gradients binaris (dos components) de concentració amb un elevat grau de precisió, sense risc d'introduir aire en el sistema. Permet fixar de forma acurada i reproducible el cabal dins d'un ampli rang d'operació que oscil·la dels 0,01 mL/min fins als 100 mL/min, amb una pressió màxima de fins a 10 MPa.
- UV-900: es tracta d'un espectrofotòmetre altament sensible, concebut per abraçar els espectres visible i ultraviolat, el qual permet la mesura simultània de fins a tres longituds d'ona en el rang que oscil·la entre 190 nm i 700 nm. La utilització d'una làmpada de xenó maximitza el temps de vida de l'equip, tot minimitzant els seus costos de manteniment.
- pH/C-900: es tracta del mòdul compacte que inclou les sondes i els indicadors per al monitoratge precís de les variables cromatogràfiques fonamentals com són el pH, la conductivitat i la temperatura. El rang de mesura de conductivitat varia de 1 μ S/cm fins a 999,9 mS/cm. Aquest ampli rang permet el seguiment sense problemes de qualsevol tècnica cromatogràfica, des de la baixa conductivitat de la cromatografia de fase reversa fins a les elevades concentracions de sal en la cromatografia d'interacció hidrofòbica. El rang de mesura de pH oscil·la entre un mínim de 2 i un màxim de 12 unitats.
- BOX-900: es tracta d'un calaix per emmagatzemar els elements addicionals (tubs, unions, etc...) necessaris per realitzar les connexions hidràuliques del cromatògraf amb els elements associats com vàlvules, columnes, injectors de mostra, etc...

Durant el procés d'inicialització de la unitat, cadascun dels mòduls realitza un diagnòstic i calibratge intern.

Finalment, en un lateral de l'equip se situen els adaptadors per encaixar les columnes i les diferents vàlvules de múltiples vies que formen part del circuit hidràulic, la descripció de les quals es mostra a la Taula 9.9.

Descripció de la vàlvula	Tipus de vàlvula
Càrrega i injecció de mostra	Vàlvula rotatòria de 7 vies (INV-907)
Selecció de columna (duplicada)	Vàlvula rotatòria de 8 vies (PV-908)
Fraccionament de sortida	Vàlvula rotatòria de 8 vies (PV-908)
Extracció de mostra	Vàlvula rotatòria de 8 vies (PV-908)
Selecció de tampó	Vàlvula rotatòria de 8 vies (IV-908)
Selecció de direcció del flux de columna	Vàlvula rotatòria de 7 vies (INV-907)

Taula 9.9. Vàlvules integrades en el sistema de cromatografia ÄKTAexplorer.

L'equip es pot connectar via port Ethernet amb un ordinador de gestió per modificar els paràmetres que controlen la purificació, tal i com es fa en aquest treball.

9.6.4.2. Equipament associat al cromatògraf FPLC

9.6.4.2.1. Col·lector de fraccions: Frac-950

El col·lector de fraccions Frac-950 (GE Healthcare, 18-6083-00) es mostra a la Figura 9.17. Aquest realitza la recollida automatitzada de la totalitat de fraccions eluïdes del sistema de

purificació. Es troba equipat amb un braç dosificador, el qual disposa d'un tanc pulmó intern per minimitzar qualsevol vessament, independentment del cabal d'elució emprat, i d'un sensor de degoteig per addicionar un volum exacte, totalment conegut, en cadascuna de les fraccions col·lectades.

Aquestes s'emmagatzemen en tubs encaixats sobre una plataforma robotitzada (*rack*) que es desplaça automàticament per canviar de tub, la qual pot presentar diverses configuracions en funció de la mida i el nombre de tubs. El model de plataforma emprat en el present treball és el *rack A*, el qual es distribueix en 120 tubs de 18 mm de diàmetre i 8 tubs addicionals de 30 mm de diàmetre.



Figura 9.17. Col·lector de fraccions Frac-950 amb el *rack A* (base de color groc).

9.6.4.2.2. Injectors de mostra

Els injectors de mostra són els components del cromatògraf on es carrega la mostra, prèviament a la seva injecció en el sistema.

A la Figura 9.18 es mostren els dos tipus emprats en aquest treball.

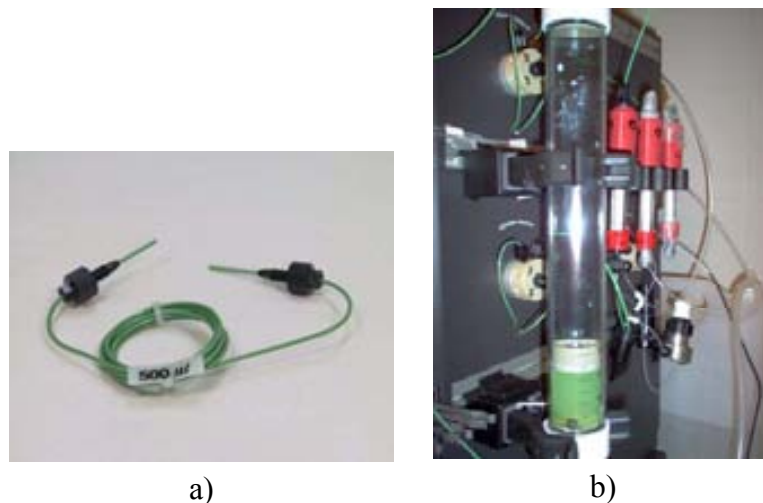


Figura 9.18. Injectors de mostra emprats en el sistema de cromatografia líquida: a) Loop 500 μL ; b) Superloop 150.

A continuació, es descriuen breument les seves característiques.

- Loop 500 μL : injector de mostra tubular (GE Healthcare, 18-1113-99) per introduir a l'interior del sistema de cromatografia un volum de 500 μL (veure Figura 9.18a). Està construït en polieterecetona, la qual cosa el fa ésser inert a la mostra i molt resistent.
- Superloop 150: injector de mostra cilíndric (GE Healthcare, 18-1028-73) recomanat per introduir a l'interior del sistema de cromatografia volums que oscil·len de 5 mL fins a 150 mL amb un rang de cabal entre 0,5 mL/min i 100 mL/min (veure Figura 9.18b). La peça principal la constitueixen dos cilindres concèntrics transparents; el més interior està construït en vidre borosilicat i conté la mostra, la qual és impulsada per un èmbol desplaçat per aigua, i el més exterior està construït en policarbonat i actua com a element protector.

9.6.4.2.3. Columnnes

Les columnnes de cromatografia emprades durant la purificació (veure Figura 9.19) no només presenten les dimensions òptimes per extreure el major rendiment de separació de les reïnes que contenen, sinó que també asseguren l'escalabilitat del procés. La reïna ja es troba prèreblerta al seu interior, prèvia a la seva utilització.

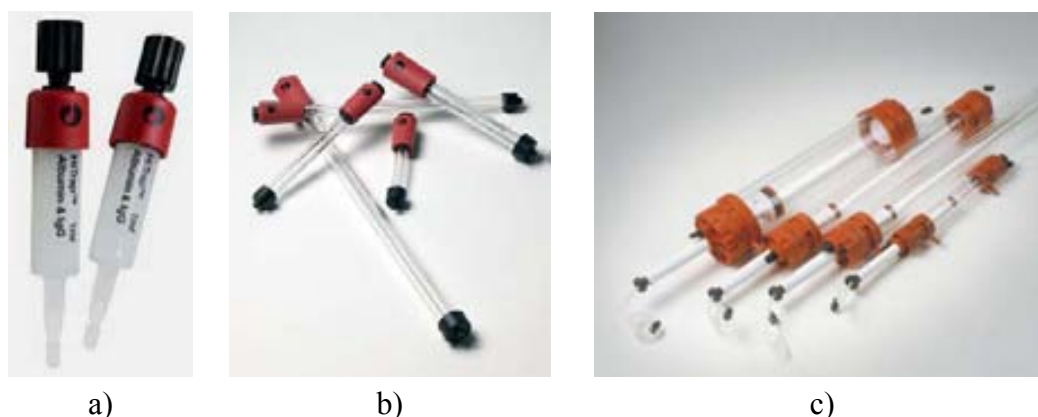


Figura 9.19. Columnnes emprades en les operacions de cromatografia, d'esquerra a dreta: columnnes HiTrap, columnnes Tricorn i columnnes XK.

Les seves especificacions tècniques es detallen a la Taula 9.10.

Model	HiTrap	Tricorn 5/50	XK 16/20	XK 16/70
Proveïdor	GE Healthcare	GE Healthcare	GE Healthcare	GE Healthcare
Referència	11-0013-02	28-4064-09	18-8773-01	18-8775-01
Diàmetre intern (mm)	7	5	16	16
Material	Polipropilè	Vidre borosilicat i diversos plàstics (polipropilè, poliamida, acrílic, fluorogoma)		
Longitud* (cm)	2,5	5	20	70
Volum del llit (mL)	1	0,69 – 1,16	5 – 31	105 – 130
Alçada del llit (cm)	2,5	3,5 – 5	2,5 – 15,5	52,5 – 65
Pressió màxima d'operació (MPa)	0,3	10	0,5	0,5

Taula 9.10. Especificacions tècniques de les columnnes emprades en les operacions de cromatografia.*
Longitud sense considerar adaptadors ni peces externes.

9.6.4.2.4. Reïnes

Segons el tipus de cromatografia, les especificacions tècniques de les reïnes emprades es detallen a la Taula 9.11.

Cromatografia	Intercanvi aniònic		Exclusió molecular
Reïna	Capto Q	Fractogel DEAE EMD (M)	Sepharose 6 Fast Flow
Proveïdor	GE Healthcare	Merck KgaA	GE Healthcare
Referència	17-5316-10	1168830010	17-0159-01
Matriu	Agarosa	Metacrilat altament reticulat	Agarosa altament reticulada (6%)
Grup funcional	Amoni quaternari	Dietilaminoetil	-
Diàmetre mitjà partícula (µm)	90	90	90
Flux màxim (cm/h)	700	800	300
pH d'operació	2 – 12	2 – 13	2 – 12
Temperatura d'operació (°C)	4 – 30	4 – 30	3 – 40

Taula 9.11. Especificacions tècniques de les reïnes emprades en les operacions de cromatografia.

9.6.4.3. Equipament per al tractament de dades

9.6.4.3.1. Ordinador de gestió

Es tracta d'un PC (Hewlett Packard, Compaq dc7700 SFF), les funcions del qual són la programació, monitoratge i supervisió dels mètodes de purificació en el cromatògraf FPLC.

Especificacions tècniques:

- Intel Core 2 Duo E6300 a 1866 MHz.
- Sistema operatiu Windows XP (Microsoft).
- 2 GB de memòria d'accés aleatori (RAM).
- 160 GB de memòria en unitat de disc dur.

9.6.4.3.2. Programari de monitoratge i control

El paquet de software comercial UNICORN (GE Healthcare) permet el control de qualsevol dels elements que integren el sistema de cromatografia, així com el monitoratge en temps real de totes les variables que descriuen el procés de purificació, independentment de l'escala que tingui, a través de l'ordinador de gestió. D'altra banda, també permet la fàcil programació dels mètodes de purificació, així com l'emmagatzematge i l'anàlisi de les dades obtingudes. Es tracta d'un software totalment validable i dissenyat per complir amb la normativa GMP (norma 21 CFR part 11 de la FDA).

Cal esmentar que els mètodes de programació emprats en aquest treball són propietat exclusiva de la Unitat Productora de Vectors (UPV) del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) (Cerdanyola del Vallès, Barcelona).

9.6.4.4. Protocol operacional

1. S'activa el sistema FPLC, i es neteja el circuit hidràulic amb aigua MilliQ.
2. S'instal·la la columna de purificació, i es neteja per eliminar el tampó de conservació que conté amb 10 volums de columna (CV) d'aigua MilliQ a un cabal de 0,3 mL/min.
3. Es condiciona el circuit hidràulic amb les solucions tampó (A i B) que s'utilitzaran per realitzar els gradients, i s'equilibra la columna amb 10 CV a un cabal de 0,5 mL/min. En tot moment, es monitoren les lectures d'absorbància a 260 nm i 280 nm.
4. S'injecta la mostra. Quan s'observa una línia base estable, es carrega aquesta en el sistema de purificació.
5. S'aplica l'estratègia d'elució amb un cabal de 0,5 mL/min. Es recullen fraccions amb un determinat volum, i s'emmagatzemen a -80 °C per al seu posterior anàlisi.
6. Després de cada experiment, es reequilibra la columna emprant les solucions tampó (10 CV) a un cabal de 0,5 mL/min.

9.6.5. Ultracentrifugació

9.6.5.1. Ultracentrífuga

La ultracentrífuga emprada és la Optima L-100XP (Beckman Coulter), la qual és capaç de generar fins a 802.400 G a velocitats de fins a 100.000 rpm. Aquest model es troba dissenyat per operar a escala laboratori i, en funció del tipus de rotor que s'utilitzi, permet centrifugar un volum màxim de 1.500 mL en una mateixa operació.

9.6.5.2. Equipament associat a la ultracentrífuga

9.6.5.2.1. Rotors

Els rotors emprats durant la ultracentrifugació (veure Figura 9.20) es troben dissenyats per resistir l'extraordinàriament elevada força centrífuga que es genera durant l'operació. Per tal de facilitar la manipulació del rotor, ofereixen la possibilitat de desmuntar les cavitats on se situen els tubs de centrifugació.

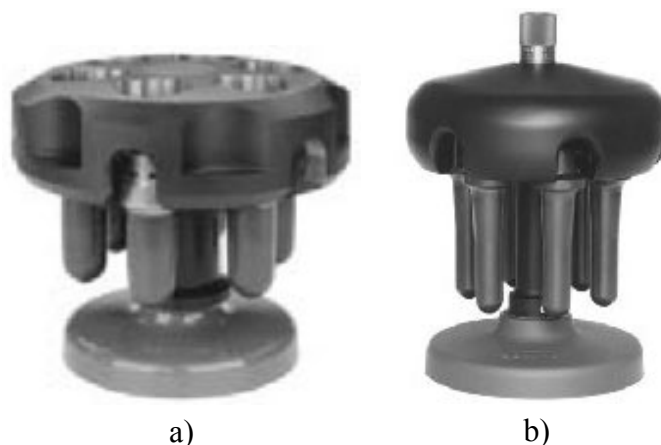


Figura 9.20. Rotors emprats en les operacions d'ultracentrifugació: a) Rotor SW32 Ti; b) Rotor SW40 Ti.

Les seves especificacions tècniques es detallen a la Taula 9.12.

Model	SW32 Ti	SW40 Ti
Proveïdor	Beckman Coulter	Beckman Coulter
Referència	369650	331302
Material	Titani	Titani
Velocitat màxima (rpm)	32000	40000
Força centrífuga màxima (G)	175.000	285.000
Nombre de cavitats	6	6
Volum màxim (mL)	231 (6 x 38,5)	84 (6 x 14)
Mida del tub (mm)	25 x 89	14 x 95

Taula 9.12. Especificacions tècniques dels rotors emprats en la ultracentrifugació.

9.6.5.3. Protocol operacional

- Es prepara la solució tampó TD (10X): 80 g de NaCl, 3,8 g de KCl, 2,5 g de Na₂HPO₄·12 H₂O (SigmaAldrich, 3264), 30 g Tris Base i 1 L d'aigua MilliQ. S'ajusta el pH a 7,4 unitats amb HCl, s'autoclava la solució i s'emmagatzema a 4 °C.
- Es preparen les següents solucions de clorur de cesi:
 - Solució A: 36,16 g CsCl (SigmaAldrich, C4036-500G) en 100 mL de solució tampó TD (1X) per obtenir una densitat de 1,25 g/mL. Es filtra la solució resultant amb un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus, i s'emmagatzema a temperatura ambient.
 - Solució B: 62,20 g CsCl (SigmaAldrich, C4036-500G) en 100 mL de solució tampó TD (1X) per obtenir una densitat de 1,40 g/mL. Es filtra la solució resultant amb un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus, i s'emmagatzema a temperatura ambient.
 - Solució C: 51,20 g CsCl (SigmaAldrich, C4036-500G) en 100 mL de solució tampó TD (1X) per obtenir una densitat de 1,34 g/mL. Es filtra la solució resultant amb un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus, i s'emmagatzema a temperatura ambient.
- S'omplen els tubs d'ultracentrifuga de 40 mL (Ultraclear) (Beckman Coulter, 344058). Cada tub conté els següents volums, afegits per ordre: 10 mL de solució A, 10 mL de solució B i 20 mL de sobrenedant inicial.
- Es realitza la primera ronda d'ultracentrifugació dels tubs, utilitzant el rotor SW32 Ti (Beckman Coulter), a 32.000 rpm i 18 °C durant 92 minuts (acceleració màxima i aturada sense frens).
- Se superposen els tubs sobre un fons negre per observar més clarament les bandes de material amb diferents densitats. Es punxa lateralment el tub per extreure la banda del virus emprant una xeringa amb agulla (PentaFerte, 08A03).
- Es buida el contingut de la xeringa (5 – 6 mL) en un nou tub d'ultracentrifuga 15 mL (Ultraclear) (Beckman Coulter, 344085). Posteriorment, s'addicionen 5 mL de solució C.
- Es realitza la segona ronda d'ultracentrifugació dels tubs, utilitzant el rotor SW40 Ti (Beckman Coulter), a 35.000 rpm i 18 °C durant 18 hores (acceleració màxima i aturada sense frens).

8. Se superposen els tubs sobre un fons negre per observar més clarament les bandes de material amb diferents densitats. Es punxa lateralment el tub per extreure la banda del virus emprant una xeringa amb agulla.
9. Es buida el contingut de la xeringa en un tub estèril de 15 mL.

9.7. Mètodes analítics

9.7.1. Anàlisi de la concentració cel·lular: recompte

Per tal de conèixer de manera directa el nombre de cèl·lules viables, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu, es porta a terme un recompte d'aquest a 100 augments mitjançant un microscopi òptic invertit de contrast de fases (Nikon, TMS) i un hemocitòmetre (*Improved Neubauer Chamber*, Brand).

L'hemocitòmetre (veure Figura 9.21a) és un portaobjectes amb dues zones per carregar la mostra, delimitades per dos canals longitudinals i un transversal. A cadascuna d'aquestes zones hi ha gravada una xarxa (veure Figura 9.21b). Dins d'aquesta xarxa es poden observar 4 camps o zones quadrades on hi ha dibuixades unes xarxes de 4x4 quadrats microscòpics de 1 mm de costat. A cada camp hi cap un volum de mostra exactament conegut de $4 \cdot 10^{-4}$ mL, i els setze quadres dibuixats faciliten el recompte de les cèl·lules presents.

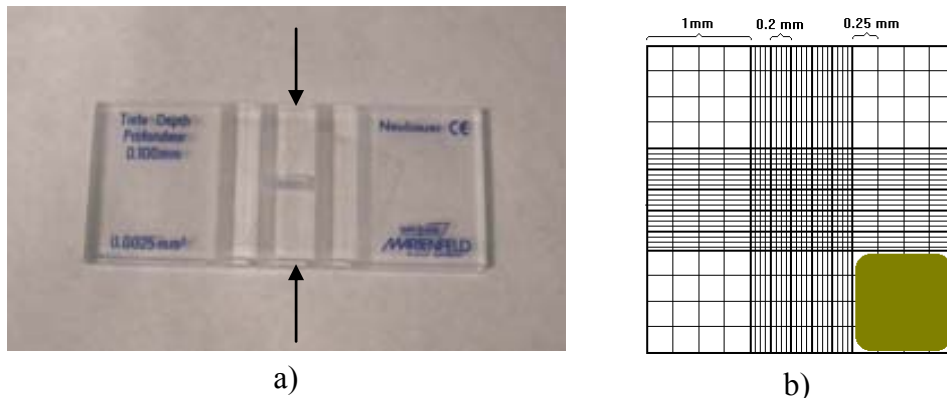


Figura 9.21.a) Hemocitòmetre. Les sagetes indiquen les zones per carregar la mostra; b) Ampliació de la zona per carregar la mostra. En verd s'indica un dels quatre camps de recompte.

9.7.1.1. Recompte cel·lular amb blau de tripà

Aquest mètode d'anàlisi de la concentració cel·lular es pot utilitzar tant en cultius no adherents com en cultius adherents, sempre prèvia aplicació del protocol de tripsinització.

Es basa en diferenciar les cèl·lules viables de les mortes, emprant una tinció amb blau de tripà (SigmaAldrich, T-8154) diluït al 0,2% (v/v) en PBS (Invitrogen, 10010-031). El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes, i els dóna un color blavós en ésser observades a través del microscopi. Per contra, les cèl·lules viables es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant [2].

A continuació, es descriu el protocol per determinar la concentració cel·lular en un cultiu no adherent:

1. Es prenen 75 µL de la mostra del cultiu, i es dilueixen a la meitat amb 75 µL de la solució de tripà blau al 0,2% (v/v).
2. Se situa el cobreobjectes sobre l'hemocitòmetre, i s'omplen les dues zones de recompte.
3. A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules viables i mortes en cadascun dels 4 camps. Els dos valors extrems (superior i inferior) obtinguts es rebutgen.
4. El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent fórmula (aplicable a cèl·lules viables i mortes):

$$\left[\frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right] = \frac{\left(\frac{n_1 + n_2}{n_c} \right)}{\left(\frac{V_{\text{camp}}}{FD} \right)} = (n_1 + n_2) 10^4$$

Equació 9.2. Expressió per al càlcul de la concentració cel·lular, on: n_1 i n_2 són el nombre de cèl·lules vives recomptades en els dos camps acceptats, n_c és el nombre de camps comptats (2), FD és el factor de dilució amb blau de tripà realitzat (2), V_{camp} és el volum de mostra present a cada camp (10^{-4} mL).

5. A partir del recompte de cèl·lules vives i mortes es pot determinar el percentatge de viabilitat del cultiu, a partir de la relació entre les cèl·lules viables i les totals.

$$\text{Viabilitat (\%)} = \left(\frac{\left[\frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right]_{\text{viables}}}{\left[\frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right]_{\text{totals}}} \right) \cdot 100$$

Equació 9.3. Expressió per al càlcul de la viabilitat cel·lular.

9.7.1.2. Recompte cel·lular per extrusió nuclear

Aquest mètode d'anàlisi de la concentració cel·lular s'utilitza habitualment en cultius adherents sobre microsuports, com a conseqüència de la complexitat de desancorar la totalitat del biocatalitzador per realitzar el recompte amb blau de tripà.

El protocol d'extrusió nuclear es basa en el dissenyat per Sanford i col. [3]:

1. Es pren una mostra homogènia de cultiu amb microsuports de 1 mL, i s'introdueix en un tub de centrifuga de 15 mL estèrils (Orange Scientific, 5540300) per afavorir la seva sedimentació.
2. Se centrifuga la mostra a 500 G durant 1 minut.
3. S'extreuen 0,8 mL de sobrenedant, i s'afegixen 1,8 mL d'una solució de cristall violeta (àcid cítric 0,1 M, cristall violeta 0,1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v)).
4. S'homogeneïtza la mostra, i s'incuba a 37 °C durant 1 hora. Per tal d'aconseguir el desancoratge i l'alliberació dels nuclis, és convenient homogeneïtzar vigorosament amb una pipeta.
5. Es recompten els nuclis, que s'han tenyit de color violeta fosc a 100 augments mitjançant un microscopi òptic invertit de contrast de fases (Nikon, TMS) i un hemocitòmetre (Neubauer Improved, Brand). Es recompten els quatre camps, es descarten els dos valors extrems, i finalment s'aplica l'Equació 9.2.

9.7.2. Anàlisi de la concentració vírica

9.7.2.1. Concentració infectiva per citometria de flux

A continuació es descriu el protocol emprat, basat en el publicat per Côte i col. [4]. Les mostres d'un mateix experiment s'han d'analitzar en un únic assaig per evitar la possible variabilitat inter-assaig. Totes les dilucions de les mostres s'haurien de realitzar per duplicat o triplicat per minimitzar la variabilitat intra-assaig:

1. Es prepara un volum de cèl·lules HEK293S en medi 293SFMII amb una concentració de $5 \cdot 10^5$ cell/mL, a partir de la dilució d'un cultiu en fase de creixement exponencial, en un tub de centrifuga de 50 mL estèrils (Orange Scientific, 5540100). Es recompta la concentració cel·lular exacta.
2. S'afegeix 1 mL d'aquesta suspensió a cada pou d'una placa de 12 (Orange Scientific, 5530400).
3. Es prepara un banc de dilucions seriades (per exemple: 1/10, 1/100, 1/1000) per duplicat o triplicat de les mostres a analitzar en tubs eppendorf.
4. S'afegeixen de 1 μ L a 50 μ L de cadascuna de les dilucions víriques en els pous, en funció de la dilució final desitjada. Es deixen un mínim de 2 pous sense infectar com a control negatiu. També és convenient infectar un mínim de 2 pous amb una mostra de títol conegut com a control positiu.
5. S'incuben les plaques durant 30-36 h sobre un agitador orbital (Stuart, SSL1) a 125 rpm, a l'interior d'un incubador estàtic a 37 °C i 8% CO₂.
6. Després del període d'incubació, es transfereix el volum de cada pou a tubs eppendorf. Se centrifuguen els tubs a 500 G durant 4 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pèl·let en 0,5 mL de PBS.
7. Per a la fixació de les cèl·lules, s'afegeixen 0,5 mL d'una solució de formaldehid freda al 4% (v/v) en PBS a cada tub eppendorf, i s'homogeneïtza bé el seu contingut.
8. S'incuben les mostres a 4 °C durant un mínim de 30 minuts o bé durant tota la nit si es realitza l'anàlisi al dia següent. Si les mostres s'han d'analitzar en dies posteriors, s'elimina el formaldehid per centrifugació, se substitueix per 1 mL de PBS, es cobreixen les mostres amb paper d'alumini i es guarden a 4 °C fins al moment de l'anàlisi.
9. Just abans de fer la determinació amb el citòmetre (Becton Dickinson, FACSCalibur), s'assegura que les mostres són homogènies emprant el vòrtex, en cas contrari, el circuit hidràulic de l'equip pot quedar obturat i malmetre's.
10. S'utilitza la mostra de control negativa per ajustar el nivell d'autofluorescència de les cèl·lules, valor GFP(-). Per minimitzar la possible autoinfecció de la mostra, només seran vàlides les dilucions de virus que proporcionin valors de percentatge GFP(+), superiors al valor GFP(-) i entre un 2% i un 20%. La concentració infectiva es determina emprant la següent equació:

$$\left[\frac{UI}{mL} \right] = \left(\frac{\%GFP(+)-\%GFP(-)}{100} \right) \cdot X_v \cdot V_{final} \cdot FD$$

Equació 9.4. Expressió per al càlcul de la concentració infectiva per citometria de flux (Unitats Infectives (UI)/mL), on: X_v és la concentració cel·lular coneguda, V_{final} és el volum final de mostra (1 mL), FD és el factor de dilució final.

9.7.2.2. Concentració física per microscòpia electrònica

La determinació de la concentració física mitjançant aquesta tècnica es basa en el recompte de partícules víriques i esferes de làtex de 100 nm de diàmetre homogèniament distribuïdes en una preparació analitzada per microscòpia electrònica de transmissió (TEM).

És fonamental conèixer perfectament la concentració d'esferes de làtex present a la solució original, la qual ha estat amablement cedida per Laboratoris Biokit (Lliçà d'Amunt, Barcelona).

A continuació es descriu el protocol emprat, basat en el publicat per Alain i col. [5]:

1. Es prepara, a partir de la solució original d'esferes de làtex ($1,62 \cdot 10^{14}$ esferes/mL), una nova solució de $1 \cdot 10^{12}$ esferes/mL en tub eppendorf (5 μ L de la solució original + 805 μ L d'aigua MilliQ).
2. A continuació, es preparen 200 μ L d'una nova solució d'esferes amb una concentració de $1 \cdot 10^{11}$ esferes/mL per dilució de l'anterior en tub eppendorf.
3. Finalment, es preparen 40 μ L d'una dilució $\frac{1}{2}$ a partir de cadascuna de les dues solucions d'esferes anteriors i de la mostra a analitzar en tub eppendorf.
4. S'aplica el protocol d'observació per tinció negativa, descrit a l'apartat 9.7.6.1, a cadascuna de les dues preparacions anteriors que contenen la mostra diluïda. Es realitzen un mínim de 20 fotografies (60.000 augments) a l'atzar dels diferents camps.
5. Es recompten les esferes i les partícules víriques de cada fotografia. La concentració física es determina emprant la següent equació:

$$\left[\frac{PV}{mL} \right] = \frac{N_{PV}}{N_{esferes}} \cdot \left[\frac{esferes}{mL} \right]_{TEM} \cdot FD$$

Equació 9.5. Expressió per al càlcul de la concentració física per microscòpia electrònica (Partícula Vírica física (PV)/mL), on: N_{PV} és el nombre de virions recomptats en la fotografia, $N_{esferes}$ és el nombre d'esferes recomptades en la fotografia, $[esferes/mL]_{TEM}$ és la concentració d'esferes emprada en la mostra que s'observa per microscòpia electrònica, FD és el factor de dilució final (2).

9.7.2.3. Concentració física per espectrofotometria

A continuació es descriu el protocol emprat, basat en el publicat per Maizel i col. [6]:

1. Es prepara una dilució de 40 mL 0,1% (p/v) SDS en aigua MilliQ.
2. Es realitzen dilucions 1/10 i 1/20 per duplicat de les mostres a analitzar, tot emprant la solució anterior amb un volum final de 100 μ L.
3. S'incuben els tubs eppendorf durant 10 minuts a 56 °C en un bany d'aigua termostàtic.
4. Se centrifuguen els tubs a 13.000 rpm durant 30 segons.
5. Es mesura l'absorbància utilitzant l'espectrofotòmetre (Eppendorf, Biophotometer) a una longitud d'ona de 260 nm (Blanc: solució 0,1% SDS). La concentració física es determina emprant la següent equació:

$$\left[\frac{PV}{mL} \right] = A_{260} \cdot 1.1 \cdot 10^{12} \cdot FD$$

Equació 9.6. Expressió per al càlcul de la concentració física per espectrofotometria (Partícula Vírica física (PV)/mL), on: A_{260} és el valor d'absorbància a 260 nm, FD és el factor de dilució final.

9.7.3. Anàlisi de la concentració de substrats i subproductes

9.7.3.1. Concentració de glucosa i lactat

Les concentracions de glucosa i lactat es mesuren amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI (Yellow Springs Instrument, 2700 Select). Aquest aparell disposa d'un elèctrode format per una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Les molècules de D-glucosa o L-lactat presents a la mostra difonen a través de la membrana, i pateixen una transformació enzimàtica per acció de la glucosa oxidasa i la lactat oxidasa, aquestes reaccions alliberen electrons que són finalment detectats per l'elèctrode. La intensitat dels senyals elèctrics produïts és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. Aquesta mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per a la mesura sigui filtrada i centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir o inactivar la membrana enzimàtica.

L'analitzador utilitza 50 µL de cada mostra, i proporciona els valors de concentració de glucosa i lactat en (g/L), amb un error de $\pm 0,1$ g/L. El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0,05 a 20,0 g/L per a la glucosa i 0,05 a 2,00 g/L per al lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua MilliQ fins que les mesures entrin en el rang.

9.7.4. Anàlisi d'àcids nucleics (DNA)

9.7.4.1. Determinació quantitativa

La determinació quantitativa d'àcids nucleics (DNA) es realitza a partir del protocol descrit en el kit d'assaig comercial Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, P7589), el qual permet mesurar concentracions de DNA en un rang des de 25 pg/mL fins a 1.000 ng/mL.

El mètode es basa en la tinció fluorescent ultrasensible de les cadenes de DNA i en la posterior mesura d'absorbància en un espectrofotòmetre de fluorescència (Cary Eclipse, Varian Inc.) amb la utilització de plaques de 96 pous de fons negre específicament dissenyades (Nunc, 437112).

9.7.4.2. Electroforesi en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per a la separació de fragments d'àcids nucleics (DNA) de diferent mida amb aplicacions tan analítiques com preparatives. Aquesta tècnica es basa en què els àcids nucleics, a pH neutre, estan carregats negativament i sota l'acció d'un camp elèctric migren cap a l'elèctrode positiu. Les molècules de DNA o RNA se separen en funció de la facilitat amb la qual migren a través de la malla que forma l'agarosa polimeritzada. La mobilitat electroforètica dels àcids nucleics és inversament proporcional a la mida de la molècula (parells de bases).

La visualització dels fragments s'aconsegueix emprant bromur d'etidi, un agent intercalant del DNA que emet fluorescència al ser irradiat amb llum ultraviolada. El bromur d'etidi

permet detectar quantitats de DNA de fins a 1 ng. La mida de les bandes visualitzades s'estableix comparant amb un marcador que conté un patró de fragments de DNA de diferents mides conegudes.

A continuació es descriu el protocol emprat.

1. Es prepara la solució tampó TBE (1X): 890 mM de Tris, 890 mM d'Àcid Bòric, 25 mM EDTA en aigua MilliQ. S'ajusta el pH a 8,3 unitats, i s'emmagatzema la solució a temperatura ambient.
2. Es prepara un gel al 0,8% (p/v) d'agarosa (SigmaAldrich, A9539-100G) en 30 mL de tampó TBE (1X). Per dissoldre l'agarosa s'escalfa la solució al microones fins que sigui transparent.
3. Es deixa refredar la solució fins a uns 40 °C.
4. Mentre es refreda la solució, es prepara el motlle del gel d'agarosa segellat amb cinta adhesiva. Es disposa la pinta de forma que quedi a 0,5-1 cm de l'extrem del motlle i que no toqui el fons d'aquest.
5. S'afegeixen 10 µL de bromur d'etidi (Bioprobe) a la solució d'agarosa.
6. Es dispensa la solució d'agarosa en el motlle, i s'espera aproximadament 10 minuts fins que l'agarosa hagi solidificat.
7. Es treu la pinta per deixar lliures els pous on es carregaran les mostres, es treu la cinta adhesiva i se submergeix el gel amb un volum de TBE (1X) suficient per cobrir del tot la seva superfície.
8. A continuació, es realitza la preparació de cadascuna de les mostres en tubs eppendorf, tot barrejant 5 µL de mostra que conté el material genètic + 1 µL de tampó de càrrega *6X DNA Loading Dye* (Fermentas, R0611).
9. Per tal d'homogeneïtzar les mostres abans de carregar-les al gel, es dona un pols de centrifugació a tots els tubs eppendorf.
10. S'omple la cel·la d'electroforesi Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) amb tampó d'electroforesi TBE (1X) i es col·loca el gel d'agarosa.
11. Es carreguen les mostres i 15 µL de marcador *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready to use* (Fermentas, SM0333) en els pous del gel.
12. Es tanca la cel·la, i s'aplica un voltatge constant de 80 V durant aproximadament 70 – 75 minuts utilitzant la font d'alimentació PowerPac 300 (Bio-Rad). S'ha d'observar un bandeig ben definit en el marcador de pesos moleculars.
13. Finalment, es visualitzen les bandes de DNA mitjançant un transil·luminador d'UV (302 nm.) (Vilber Lourmat, TFX-20.MC). Per mirar les bandes sobre el gel quan el transil·luminador està funcionant cal obligatòriament utilitzar ulleres de protecció. Les fotografies obtingudes dels gels es realitzen amb una càmera (Kodak DC120).

9.7.5. Anàlisi de proteïnes

9.7.5.1. Determinació quantitativa

La determinació quantitativa de proteïnes es realitza a partir del protocol descrit en el kit d'assaig comercial de proteïnes BCA (Thermo Scientific, 23227), el qual permet mesurar concentracions de proteïnes en un rang des de 20 fins a 2.000 µg/mL.

El mètode es basa en dues reaccions en sèrie. En primer lloc, la reducció dels cations Cu^{2+} a Cu^+ per part de les proteïnes en medi bàsic (reacció de Biuret) i, en segon lloc, la reacció altament sensible i selectiva entre els ions Cu^+ i l'àcid bicinconínic (BCA) per proporcionar una intensa coloració porpra. Es mesura l'absorbància amb un espectrofotòmetre NanoDrop 1000 UV/Vis (Thermo Scientific) a 562 nm que és directament proporcional a la concentració de proteïnes de la mostra.

9.7.5.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel de poliacrilamida s'utilitza per a la separació de proteïnes de diferents pesos moleculars amb aplicacions tan analítiques com preparatives. Aquesta tècnica es basa en el tractament tèrmic de les mostres amb un detergent aniònic com el dodecilsulfat sòdic (SDS), que elimina les estructures secundària i terciària de la proteïna i li proporciona càrrega negativa uniforme. De manera que, sota l'acció d'un camp elèctric, aquestes migren cap a l'elèctrode positiu. Les proteïnes se separen en funció de la facilitat amb la qual migren a través de la malla que forma la poliacrilamida polimeritzada. La mobilitat electroforètica de les proteïnes és inversament proporcional al seu pes molecular.

La visualització de les proteïnes, en forma de banda al gel, s'aconsegueix gràcies al procés de tinció del mateix. El pes molecular de cadascuna s'estableix comparant-les amb un marcador que conté un patró proteïnes de diferents mides conegudes.

A continuació es descriu el protocol emprat, basat en el publicat per Sambrook i col. [7].

1. No és necessària la preparació de gels de poliacrilamida, ja que se n'adquireixen de prèviament preparats NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 12 well (Invitrogen, NP0322BOX).
2. Es realitza la preparació de cadascuna de les mostres en tubs eppendorf, tot barrejant 30 μL de mostra que conté les proteïnes + 10 μL de tampó de càrrega (4X) (Invitrogen, NP0007).
3. S'incuba la mostra en un bany d'aigua termostàtic a 80 °C durant 10 minuts per procedir a la desnaturalització de les proteïnes abans de ser carregades al gel. Un cop es retiren les mostres del bany, es mantenen en gel per evitar la seva degradació.
4. Una vegada refredades, se centrifuguen a 16.000 rpm durant 2 minuts.
5. S'omple la cel·la d'electroforesi XCell SureLock (Invitrogen) amb tampó d'electroforesi MOPS (Invitrogen, NP0001), i es col·loca el gel de poliacrilamida.
6. Es carreguen 10 μL de cadascuna de les mostres i de marcador de pesos moleculars SeeBlue Plus2 (Invitrogen, LC5925) en els pous del gel, utilitzant la xeringa Microliter (Hamilton, 80330).
7. Es tanca la cel·la i s'aplica un voltatge constant de 150 V durant aproximadament 60 minuts utilitzant la font d'alimentació PowerPac Basic (Bio-Rad). S'ha d'observar un bandeig ben definit en el marcador de pesos moleculars.
8. S'aplica el protocol de tinció de plata descrit en el kit d'assaig comercial Silver Stain Plus (Bio-Rad, 161-0449) per visualitzar les bandes de proteïnes en el gel.

9. Finalment, el gel s'asseca i s'escaneja utilitzant el sistema de documentació i anàlisi de gels GeneGenius BioImaging System (Syngene).

9.7.5.3. Assaig immunològic (Western Blot)

La tècnica de transferència Western permet la detecció específica de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos, els quals reconeixen una regió específica de la proteïna, sobre una membrana de nitrocel·lulosa. És una tècnica que complementa la tècnica d'electroforesi, i permet assegurar que una proteïna d'una determinada mida disposa d'una regió reconeguda específicament per un anticòs.

A continuació es descriu el protocol emprat.

1. Es preparen les següents solucions:
 - Solució Tris-Glicina (10X): 30,3 g de Tris Base, 144 g de Glicina i 1 L d'aigua MilliQ.
 - Solució tampó de transferència: 100 mL de Tris-Glicina (10X), 200 mL d'etanol 95% i 700 mL d'aigua MilliQ. Es desgasifica durant 15 minuts, i la solució s'emmagatzema a temperatura ambient.
 - Solució PBST (1X): 8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 2,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, Tween 0,1% (v/v) i 1 L d'aigua MilliQ. S'ajusta el pH 7,4 unitats.
2. Es retallen les membranes de nitrocel·lulosa de 0,45 μm (Bio-Rad) i el paper de filtre de la mateixa mida que la del gel de proteïnes, i se submergeixen conjuntament en tampó de transferència per hidratar-les i equilibrar-les.
3. Es munta l'anomenat sandvitx de transferència, tal i com s'indica a la Figura 9.22. És recomanable realitzar tot el muntatge submergit en tampó de transferència, per assegurar la hidratació de tots els components i per evitar la formació de bombolles d'aire entre les capes. Un cop es situen les dues primeres esponges, s'ubica un tros de paper de filtre. A continuació, s'extreu el gel del vidre amb cura de no trencar-lo, dipositant-lo sobre el paper de filtre. Per extreure el gel, es recomana fer-ho submergint-lo en el recipient del tampó. Posteriorment, es diposita la membrana hidratada sobre el gel, es mulla amb tampó de transferència procurant que no es formin bombolles d'aire entre el gel i la membrana, i si es necessari, cal eliminar les bombolles d'aire pentinant suaument la membrana. Finalment, es posa un altre tros de paper de filtre, les dues darreres esponges i es tanca el casset.

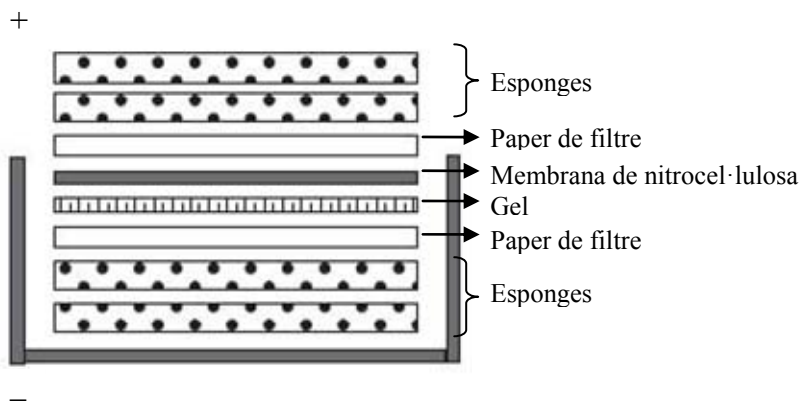


Figura 9.22. Esquema del muntatge del casset per a la transferència Western.

4. Es col·loca el sandvitx a la cel·la de transferència Mini Trans-Blot (Bio-Rad), i s'omple amb tampó de transferència.
5. Es tanca la cel·la i s'aplica un amperatge constant de 300 mA durant aproximadament 60 minuts utilitzant la font d'alimentació PowerPac Basic (Bio-Rad), en l'interior d'una cambra freda, o introduint la cel·la en un bany amb gel.
6. Un cop finalitzat el procés, es desmunta el sandvitx i es recupera la membrana de nitrocel·lulosa. Aquesta es bloqueja emprant la solució PBST amb un 5% (p/v) de llet en pols (Nestlé) durant 12 hores agitant-se a 4 °C.
7. Es renta la membrana tres vegades durant 5 minuts submergint-la en PBST.
8. A continuació, la membrana s'incuba durant unes 10 hores amb l'anticòs primari *Rabbit polyclonal against Ad5* (ABCAM, ab6982) amb una dilució 1:20000 en PBST.
9. Seguidament, es realitzen de nou tres rentats de 5 minuts en PBST.
10. S'incuba durant una hora amb l'anticòs secundari *Polyclonal swine anti-rabbit HRP* (DAKO, P0399) amb una dilució 1:30.000 en PBST, el qual permetrà detectar les bandes per revelat quimioluminiscent.
11. Es realitzen 3 rentats per netejar la membrana de les restes d'anticòs secundari amb PBST, i s'asseca la membrana dipositant-la suaument sobre paper de filtre net.
12. Es prepara la mescla dels reactius de revelat pico (Pierce) segons la quantitat de proteïna esperada, i es procedeix a la detecció quimioluminiscent. És recomanable fer diverses exposicions de diferents temps i així veure en quin dels casos s'aconsegueix visualitzar millor les bandes en les pel·lícules autoradiogràfiques.
13. Després de l'exposició de la pel·lícula fotogràfica a la radiació produïda per la membrana, s'introdueix a la cubeta amb líquid revelador (B&W Paper Developer, Neutol Liquid NE, Agfa), i s'agita suaument. Visualment, es controla que el nivell de revelat no sigui massa fort, ja que pot cremar la pel·lícula. Quan s'aprecia l'aparició de les bandes, s'extreu la pel·lícula i s'introdueix en el líquid fixador (B&W fixer, Agefix, Agfa) durant 5 minuts. Finalment, es renta amb aigua destil·lada i es deixa assecar.

Els revelats es duen a terme en una cambra fosca il·luminada amb una làmpada vermella de 10 W, i s'utilitza un agitador orbital (Heidolph), cubetes on dipositar-hi l'aigua per rentar les pel·lícules i les dissolucions reveladora i fixadora. S'utilitzen cassets i pel·lícules de radiografia (Amersham Life Science).

9.7.6. Microscòpia electrònica

9.7.6.1. Observació per tinció negativa

1. Es pipetegen 20 µL de mostra sobre la superfície d'un pou d'una placa de 12 (Orange Scientific, 5530400), anomenat A.
2. Es pipetegen 20 µL d'àcid fosfotúngstic en un nou pou de la mateixa placa, anomenat B.
3. Tot seguit, es pinça la reixeta de coure PELCO 300 (TED PELLA, 1GC300) amb les pinces d'alta precisió Miracle Tip (SPI Supplies, 0S04X-XD). És molt important tractar amb molt de compte i no malmetre la superfície de la reixeta degut a les seves reduïdes dimensions i elevada fragilitat.

4. Es posa en contacte una de les dues superfícies de la reixeta amb la mostra continguda en el pou A durant un o dos minuts.
5. Es torna a pinçar i la reixeta s'asseca, posant lleugerament en contacte el seu contorn amb paper de filtre.
6. Sense deixar-la anar, la reixeta es mou al pou B i es repeteixen els dos passos anteriors.
7. La preparació final se situa en un nou pou de la placa sobre paper de filtre, es tanca la placa i es deixa assecar, com a mínim, durant 30 minuts addicionals.
8. S'observa i fotografia la mostra amb el microscopi electrònic de transmissió (JEOL, JEM 1400) a diferents augments.

9.8. Bibliografia

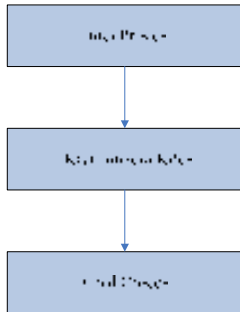
1. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. 1977. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology 36(1): 59-72.
2. Freshney, R.I. 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. New York (NY): Wiley-Liss. 577 p.
3. Sanford, K.K., Earle, W.R., Evans, V.J., Waltz, H.K. and Shannon, J.E. 1951. *The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei*. Journal of the National Cancer Institute 11(4): 773-795.
4. Côté, J., Bourget, L., Garnier, A. and Kamen, A. 1997. *Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring*. Biotechnology progress 13(6): 709-714.
5. Alain, R., Nadon, F., Seguin, C., Payment, P. and Trudel, M. 1987. *Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids*. Journal of virological methods 16(3): 209-216.
6. Maizel, J.V., White, D.O. and Scharff, M.D. 1968. *The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12*. Virology 36(1): 115-125.
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY p.

10. APÈNDIX

10. APÈNDIX

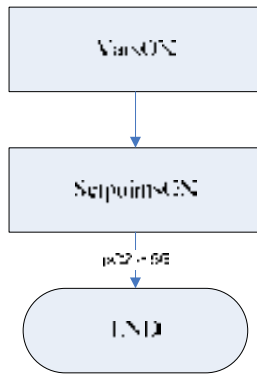
10.1. Informes de les receptes de control

10.1.1. Recepta KDES

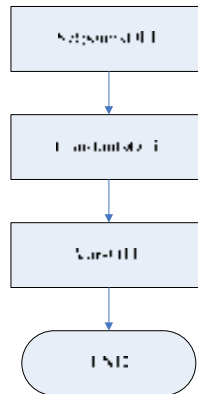


10.1.1.1. Operacions

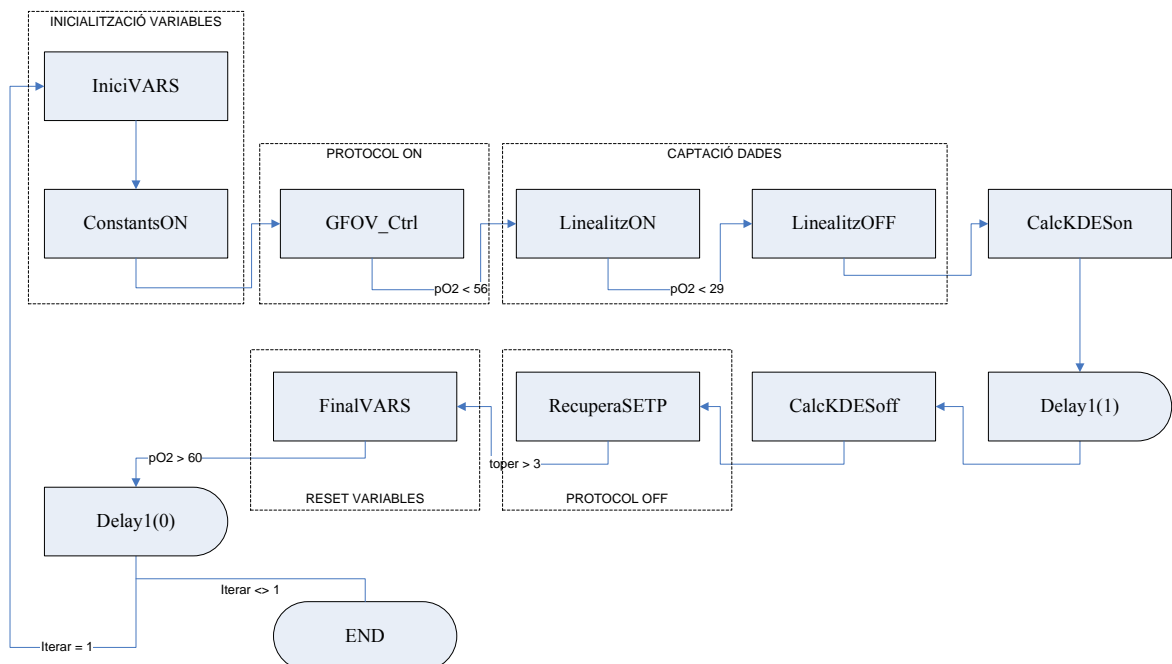
Inici procés



Final Procés



Determinació Kdes



10.1.1.2. Fases

Phase: CalcKDESOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula kdes	Calculation	Off

Phase: CalcKDESON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula kdes	Calculation	On

Phase: ConstantsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula Glocalm	Calculation	Off
Formula Glocsp	Calculation	Off
Formula iterar	Calculation	Off
Fórmula liminf	Calculation	Off
Formula limsup	Calculation	Off
Formula qGlc	Calculation	Off
Formula qO2	Calculation	Off
Formula temps	Calculation	Off

Phase: ConstantsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula Glocalm	Calculation	On
Formula Glocsp	Calculation	On
Formula iterar	Calculation	On

Fórmula liminf	Calculation	On
Formula limsup	Calculation	On
Formula qGlc	Calculation	On
Formula qO2	Calculation	On
Formula temps	Calculation	On

Phase: FinalVARS

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula toper	Calculation	Off
PO2	Setpoint	100
tinioper	Var_status	Off
toper	Var_status	Off

Phase: GFOV_Ctrl

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
GF_SP	Ctrl_mode	Off
PO2	Setpoint	0
GF_OV	Ctrl_mode	Auto
GF_OV	Setpoint	0.45
Formula tinioper	Calculation	On

Phase: InicIVARS

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
tinioper	Var_status	On
toper	Var_status	On
contador	Var_status	On

sumt	Var_status	On
sumt2	Var_status	On
sumpO2	Var_status	On
sumpO2t	Var_status	On
kdes	Var_status	On
Formula contador	Calculation	Off
Formula sumpO2	Calculation	Off
Formula sumt	Calculation	Off
Formula sumt2	Calculation	Off
Formula sumapO2t	Calculation	Off

Phase: LiniatizOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula contador	Calculation	Off
Formula sumpO2	Calculation	Off
Formula sumt	Calculation	Off
Formula sumt2	Calculation	Off
Formula sumapO2t	Calculation	Off

Phase: LiniatizON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula tinioper	Calculation	Off
Formula toper	Calculation	On
Formula contador	Calculation	On
Formula sumpO2	Calculation	On
Formula sumt	Calculation	On
Formula sumt2	Calculation	On

Formula sumapO2t	Calculation	On
------------------	-------------	----

Phase: RecuperaSETP

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
GF_OV	Ctrl_mode	Off
PO2	Setpoint	50
GF_SP	Ctrl_mode	Auto
GF_SP	Setpoint	0.45
kdes	Var_status	Off
contador	Var_status	Off
sumt	Var_status	Off
sumt2	Var_status	Off
sumpO2	Var_status	Off
sumpO2t	Var_status	Off

Phase: SetpointsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
PO2	Ctrl_mode	Off
STIRR	Ctrl_mode	Off
GF_OV	Ctrl_mode	Off
GF_SP	Ctrl_mode	Off
TEMP	Ctrl_mode	Off

Phase: SetpointsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
TEMP	Ctrl_status	Remote

TEMP	Ctrl_mode	Auto
TEMP	Setpoint	37
STIRR	Ctrl_status	Remote
STIRR	Ctrl_mode	Auto
STIRR	Setpoint	75
PO2	Ctrl_status	Remote
PO2	Ctrl_mode	Auto
PO2	Setpoint	100
GF_SP	Ctrl_status	Remote
GF_SP	Ctrl_mode	Auto
GF_SP	Setpoint	0.45
GF_OV	Ctrl_status	Remote
GF_OV	Ctrl_mode	Off
Formula limsup	Calculation	On

Phase: VarsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
all variables	Var_status	Off
all variables	store	Off

Phase: VarsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
all variables	Var_status	On
all variables	store	On

Wait Phase	
Phase:	Delay1
Wait Until	
Duration:	00 hour(s) 00 minute(s) 05 second(s)

Transition		
Phase: Delay1		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes005	iterar<>1	Delay1.Transition2_value = iterar.Value <> 1
Determinacio de la kdes004	iterar=1	Delay1.Transition1_value = iterar.Value = 1

Phase: FinalVARS		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes003	pO2>60	FinalVARS.Transition1_value = PO2.Value >= (limsup.Value + 4)

Phase: GFOV_Ctrl		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes000	pO2>56	GFOV_Ctrl.Transition1_value = PO2.Value < limsup.Value

Phase: LinialitzON		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes001	pO2<29	LinialitzON.Transition1_value = PO2.Value < liminf.Value

Phase: RecuperaSETP		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes002	toper>3	RecuperaSETP.Transition1_value = toper.Value >= temps.Value

Phase: SetpointsON		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Determinacio de la kdes006	pO2>56	SetpointsON.Transition1_value = PO2.Value >= limsup.Value

10.1.2.2. Fases

Phase: BatchOperfusio

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula perfusió	Calculation	On

Phase: CalcOURoff

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula OUR	Calculation	Off
Formula OUR_10	Calculation	Off
Formula OUR_20	Calculation	Off
Formula OUR_30	Calculation	Off
Formula OUR_40	Calculation	Off
Formula tOUR_10	Calculation	Off
Formula tOUR_20	Calculation	Off
Formula tOUR_30	Calculation	Off
Formula tOUR_40	Calculation	Off

Phase: CalcOURon

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula OUR	Calculation	On
Formula OUR_10	Calculation	On
Formula OUR_20	Calculation	On
Formula OUR_30	Calculation	On
Formula OUR_40	Calculation	On
Formula tOUR_10	Calculation	On

Formula tOUR_20	Calculation	On
Formula tOUR_30	Calculation	On
Formula tOUR_40	Calculation	On

Phase: CalcPUMPOff

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula muOUR_num	Calculation	Off
Formula muOUR_den	Calculation	Off
Formula muOUR	Calculation	Off
Formula Qadd	Calculation	Off

Phase: CalcPUMPOn

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula muOUR_num	Calculation	On
Formula muOUR_den	Calculation	On
Formula muOUR	Calculation	On
Formula Qadd	Calculation	On
Formula subsa setpoint	Calculation	On

Phase: ConstantsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula Gicalm	Calculation	Off
Formula Giscsp	Calculation	Off
Formula iterar	Calculation	Off
Fórmula liminf	Calculation	Off
Formula limsup	Calculation	Off

Formula qGlc	Calculation	Off
Formula qO2	Calculation	Off
Formula temps	Calculation	Off

Phase: ConstantsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula Gicalm	Calculation	On
Formula Giscsp	Calculation	On
Formula iterar	Calculation	On
Fórmula liminf	Calculation	On
Formula limsup	Calculation	On
Formula qGlc	Calculation	On
Formula qO2	Calculation	On
Formula temps	Calculation	On

Phase: FinalVARS

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula toper	Calculation	Off
PO2	Setpoint	100
tinioper	Var_status	Off
toper	Var_status	Off

Phase: GFOV_Ctrl

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
GF_SP	Ctrl_mode	Off
PO2	Setpoint	0

pH	Ctrl_mode	Off
GF_OV	Ctrl_mode	Auto
GF_OV	Setpoint	0.45
Formula tinioper	Calculation	On
Formula tiniOUR	Calculation	On
Formula pO2iniOUR	Calculation	On

Phase: InicIVARS

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
tinioper	Var_status	On
toper	Var_status	On
pO2ant	Var_status	On
tant	Var_status	On
pO2iniOUR	Var_status	On
tiniOUR	Var_status	On
pO2int	Var_status	On
OURcalc	Var_status	On
muOUR_num	Var_status	On
muOUR_den	Var_status	On
muOUR	Var_status	On
perf	Var_status	On

Phase: OUR

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Formula toper	Calculation	On
Formula tant	Calculation	On
Formula pO2ant	Calculation	On

Formula pO2int	Calculation	On
Formula pO2iniOUR	Calculation	Off
Formula tiniOUR	Calculation	Off
Formula tinioper	Calculation	Off

Phase: PumpONlevelON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
SUBSA	Ctrl_status	Remote
SUBSA	Ctrl_mode	Auto
CLEVEL	Ctrl_status	Remote
CLEVEL	Ctrl_mode	Auto

Phase: RecuperaSETP

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
GF_OV	Ctrl_mode	Off
PO2	Setpoint	50
GF_SP	Ctrl_mode	Auto
GF_SP	Setpoint	0.45
pH	Ctrl_mode	Auto
pH	Setpoint	7.1
Formula tant	Calculation	Off
Formula pO2ant	Calculation	Off
Formula pO2int	Calculation	Off
OURcalc	Var_status	Off
pO2int	Var_status	Off
pO2iniOUR	Var_status	Off
tiniOUR	Var_status	Off

pO2ant	Var_status	Off
tant	Var_status	Off
muOUR	Var_status	Off
muOUR_den	Var_status	Off
muOUR_num	Var_status	Off

Phase: SetpointsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
PO2	Ctrl_mode	Off
pH	Ctrl_mode	Off
STIRR	Ctrl_mode	Off
GF_OV	Ctrl_mode	Off
GF_SP	Ctrl_mode	Off
TEMP	Ctrl_mode	Off
SUBSA	Ctrl_mode	Off
CLEVEL	Ctrl_mode	Off
FOAM	Ctrl_mode	Off

Phase: SetpointsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
TEMP	Ctrl_status	Remote
TEMP	Ctrl_mode	Auto
TEMP	Setpoint	37
STIRR	Ctrl_status	Remote
STIRR	Ctrl_mode	Auto
STIRR	Setpoint	75
PO2	Ctrl_status	Remote

Phase: SetpointsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
TEMP	Ctrl_status	Remote
TEMP	Ctrl_mode	Auto
TEMP	Setpoint	37
STIRR	Ctrl_status	Remote
STIRR	Ctrl_mode	Auto
STIRR	Setpoint	75
PO2	Ctrl_status	Remote

PO2	Ctrl_mode	Auto
PO2	Setpoint	100
pH	Ctrl_status	Remote
pH	Ctrl_mode	Auto
pH	Setpoint	7.1
GF_SP	Ctrl_status	Remote
GF_SP	Ctrl_mode	Auto
GF_SP	Setpoint	0.45
GF_OV	Ctrl_status	Remote
GF_OV	Ctrl_mode	Off
FOAM	Ctrl_status	Remote
FOAM	Ctrl_mode	Auto
Formula limsup	Calculation	On

Phase: VarsOFF

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
all variables	Var_status	Off
all variables	store	Off
Formula subsa setpoint	Calculation	Off

Phase: VarsON

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
all variables	Var_status	On
all variables	store	On

Wait Phase		
Phase: Delay		
Wait Until		
Duration:	00 hour(s) 00 minute(s) 05 second(s)	
Transition		
Phase: Delay		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac008	iterar<>1	Delay.Transition2_value = iterar.Value <> 1
Batch-Perfusio amb alimentac007	iterar=1	Delay.Transition1_value = iterar.Value = 1
Phase: FinalVARS		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac006	pO2>60	FinalVARS.Transition1_value = PO2.Value >= (limsup.Value + 4)
Phase: GFOV_Ctrl		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac001	pO2<56	GFOV_Ctrl.Transition1_value = PO2.Value <= limsup.Value
Phase: OUR		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac002	pO2<29	OUR.Transition1_value = PO2.Value <= liminf.Value

Phase: RecuperaSETP		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac005	toper>3	RecuperaSETP.Transition1_value = toper.Value >= temps.Value
Phase: SetpointsON		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac000	pO2>56	SetpointsON.Transition1_value = PO2.Value >= limsup.Value
Phase: Transicio		
Algorithm Name	Title	Transition formula
Batch-Perfusio amb alimentac004	perf<>0	Transicio.Transition2_value = perf.Value <> 0
Batch-Perfusio amb alimentac003	perf=0	Transicio.Transition1_value = perf.Value = 0

10.1.3. Variables i constants

Variable Information:			Ranges:			Alarming:		Warning:			Alarm:			Input Channel:		
No.	Variable Tag	Eng. Units	Low	High	Alarm Blk.	Mode	Deadb.	Low	High	Alarm Blk.	Low Low	High High	Alarm Blk.	Chn.	Low	High

Cyclic Variables for Control Unit: Calculation Manager

25	contador		0	<input type="checkbox"/> 0	1E+06	Off	0	0	1E+06		0	1E+06					
Description:		Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar kdes.															
26	Count		0	<input type="checkbox"/> 0	990	Off	0	0	990		0	990					
Description:																	
27	Glcalm	mM	3	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Concentració de glucosa a l'aliment.															
28	Glosp	mM	3	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Concentració de glucosa al setpoint.															
29	Iterar		0	<input type="checkbox"/> 0	10	Off	0	0	10		0	10					
Description:		Creada per JGS. Variable d'iteració (1=OK, 0=NOK).															
30	kdes	h-1	6	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Valor de la constant de desorció.															
31	kla	h-1	6	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Valor del coeficient volumètric de transferència de matèria de l'oxigen.															
32	liminf	%	2	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Límit inferior de l'oxigen per realitzar un cicle d'OUR o kdes.															
33	limsup	%	1	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Límit superior de l'oxigen per realitzar un cicle d'OUR o kdes.															
34	muOUR	h-1	6	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Velocitat específica de creixement basada en la OUR.															
35	muOUR_den		6	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar muOUR.															
36	muOUR_num		6	<input type="checkbox"/> 0	100	Off	0	0	100		0	100					
Description:		Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar muOUR.															
37	OUR	mM/h	0	<input type="checkbox"/> 0	1000	Off		0	1000		0	1000					
Description:																	

Variable Information:				Ranges:			Alarming:		Warning:			Alarm:			Input Channel:		
No.	Variable Tag	Eng. Units	Totalizer After Dec.	Low	High	Alarm Blk.	Mode	Deadb.	Low	High	Alarm Blk.	Low Low	High High	Alarm Blk.	Chn.	Low	High
Description:																	
38	OUR_10	mM/h	8	<input type="checkbox"/>	0	10		Off	0	0	10		0	10			
Description: Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de ln(OURcalc).																	
39	OUR_20	mM/h	8	<input type="checkbox"/>	0	10		Off	0	0	10		0	10			
Description: Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de OUR_10.																	
40	OUR_30	mM/h	8	<input type="checkbox"/>	0	10		Off	0	0	10		0	10			
Description: Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de OUR_20.																	
41	OUR_40	mM/h	1	<input type="checkbox"/>	0	100		Off	0	0	100		0	100			
Description: Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de OUR_30.																	
42	OURcalc	mM/h	8	<input type="checkbox"/>	0	10		Off	0	0	10		0	10			
Description: Creada per JGS. Oxygen Uptake Rate.																	
43	perf		0	<input type="checkbox"/>	0	10		Off	0	0	10		0	10			
Description: Creada per JGS. Variable per diferenciar fase perfusió o batch (1=PERF, 0=BATCH).																	
44	pO2ant	%Sat	2	<input type="checkbox"/>	0	200		Off	0	0	200		0	200			
Description: Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de pO2.																	
45	pO2iniOUR	%Sat	2	<input type="checkbox"/>	0	200		Off	0	0	200		0	200			
Description: Creada per JGS. Valor inicial de pO2 per determinar la OUR.																	
46	pO2int	%Sat/h	8	<input type="checkbox"/>	0	100		Off	0	0	100		0	100			
Description: Creada per JGS. Valor de integral analítica pO2 vs t.																	
47	Qadd	ml/min	8	<input type="checkbox"/>	0	100		Off	0	0	100		0	100			
Description: Creada per JGS. Cabal d'alimentació de la bomba en perfusió.																	
48	qGlc	nmol/(10 ⁶ ce l-h)	1	<input type="checkbox"/>	0	1000		Off	0	0	1000		0	1000			
Description: Creada per JGS. Consum específic de glucosa.																	
49	qO2	nmol/(10 ⁶ ce l-h)	1	<input type="checkbox"/>	0	1000		Off	0	0	1000		0	1000			

Apèndix

Variable Information:				Ranges:			Alarming:		Warning:			Alarm:			Input Channel:		
No.	Variable Tag	Eng. Units	Totalizer After Dec.	Low	High	Alarm Blk.	Mode	Deadb.	Low	High	Alarm Blk.	Low Low	High High	Alarm Blk.	Chn.	Low	High
49	qO2	nmol/(10 ⁶ l·h)	1 <input type="checkbox"/> 0	1000			Off	0	0	1000		0	1000				
Description:				Creada per JGS. Consum específic d'oxigen.													
50	RQ		2 <input type="checkbox"/> 0	5			Off		0	5		0	5				
Description:																	
51	sumpO2	%Sat	2 <input type="checkbox"/> 0	100000			Off	0	0	100000		0	100000				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar kdes.													
52	sumpO2t	%Sat·h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar kdes.													
53	sumt	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar kdes.													
54	sumt2	h ²	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+07			Off	0	0	1E+07		0	1E+07				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per determinar kdes.													
55	tant	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de t.													
56	temps	h	2 <input type="checkbox"/> 0	100			Off	0	0	100		0	100				
Description:				Creada per JGS. Temps predeterminat per repetir un procés cíclic.													
57	inioper	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Valor de temps inicial on comença un procés iteratiu.													
58	iniOUR	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Valor inicial de temps per determinar la OUR.													
59	toper	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1E+06			Off	0	0	1E+06		0	1E+06				
Description:				Creada per JGS. Temps predeterminat per realitzar un cicle iteratiu.													
60	tOUR_10	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1000			Off	0	0	1000		0	1000				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de temps.													
61	tOUR_20	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1000			Off	0	0	1000		0	1000				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de tOUR_10.													
62	tOUR_30	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1000			Off	0	0	1000		0	1000				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de tOUR_20.													
63	tOUR_40	h	8 <input type="checkbox"/> 0	1000			Off	0	0	1000		0	1000				
Description:				Creada per JGS. Variable auxiliar per guardar el valor previ de tOUR_30.													

Variable Information:				Ranges:			Alarming:		Warning:			Alarm:			Input Channel:		
No.	Variable Tag	Eng. Units	Totalizer After Dec.	Low	High	Alarm Blk.	Mode	Deadb.	Low	High	Alarm Blk.	Low Low	High High	Alarm Blk.	Chn.	Low	High

Controller for Control Unit: Biostat B PLUS 2 L CC

64	CLEVEL		1	0	100	Abs	Off	0	0	100	0	100	1	0	8	0	1000	6	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:	Creat per JGS. Control de nivell.																			
65	FOAM		1	0	100	Abs	Off	0	0	100	0	100	1	0	7	0	1000	5	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:	Creat per JGS. Control d'antiescumant.																			
66	GF_OV	l/m	2	0	10	Abs	Off	0	0	10	0	10	1	0	13	0	1000	10	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				
67	GF_SP	l/m	3	0	1	Abs	Off	0	0	1	0	1	1	0	14	0	1000	11	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				
68	pH	pH	3	2	12	Abs	Off	1	2	12	2	12	0	0	3	0	1000	3	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				
69	PO2	%Sat	2	0	100	Abs	Off	1	0	100	0	100	0	0	4	0	1000	4	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				
70	STIRR	rpm	0	0	2000	Abs	Off	1	10	2000	10	2000	0	0	2	0	1000	2	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:	Popup/File/Beeper																			
71	SUBSA	%	1	0	100	Abs	Off	0	0	100	0	100	1	0	10	0	1000	7	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				

Apèndix

Variable Information:					Ranges:			Alarming:		Warning:			Alarm:			Input Channel:					
No.	Variable Tag	Eng. Units	After Dec.	Totalizer	Low	High	Alarm Blk.	Mode	Deadb.	Low	High	Alarm Blk.	Low Low	High High	Alarm Blk.	Chn.	Low	High			
72	SUBSB	%	1	0	100	Abs	Off	0	0	100	0	100	1	0	12	0	1000	8	0	1000	0
	DCU Controller																				
	Description:																				
73	TEMP	Degr C	1	0	150	Abs	Off	1	25	150	25	150	0	0	1	0	1000	1	0	1000	0
	DCU Controller				Popup/File/Beeper				Popup/File/Beeper			Popup/File/Beeper									
	Description:																				

No.	Variable Tag	Value	Unit	After Decimals	Description
-----	--------------	-------	------	----------------	-------------

Constants:

87	kdescalc	0.4127	h-1	4	Creada per JGS. Constant de desorció.
88	Vreac	2000	ml	1	Creada per JGS. Volum del bioreactor

10.1.4. Fórmules

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

1	Fórmula liminf	liminf	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Fórmula liminf	
---	----------------	--------	-------	--	---	--------------------------	---	----------------	--

Formula: liminf.Value = 29

Description:

2	Formula qO2	qO2	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula qO2	
---	-------------	-----	-------	--	---	--------------------------	---	-------------	--

Formula: qO2.Value = 219

Description:

5	Formula Gicalm	Gicalm	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula Gicalm	
---	----------------	--------	-------	--	---	--------------------------	---	----------------	--

Formula: Gicalm.Value = 25

Description:

6	Formula Glcsp	Glcsp	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula Glcsp	
---	---------------	-------	-------	--	---	--------------------------	---	---------------	--

Formula: Glcsp.Value = 5

Description:

8	Batch-Perfusio amb alimentac003	Transicio		1.79769313E+308		<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac003	perf=0
---	---------------------------------	-----------	--	-----------------	--	--------------------------	---	---------------------------------	--------

Formula: Transicio.Transition1_value = perf.Value = 0

Description:

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

.....

10	Formula limsup	limsup	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula limsup	
----	----------------	--------	-------	--	---	--------------------------	---	----------------	--

Formula: limsup.Value = 56

Description:

.....

11	Batch-Perfusio amb alimentac000	SetpointsON		1.79769313E+308		<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac000	pO2>56
----	---------------------------------	-------------	--	-----------------	--	--------------------------	---	---------------------------------	--------

Formula: SetpointsON.Transition1_value = PO2.Value >= limsup.Value

Description:

.....

12	Batch-Perfusio amb alimentac002	OUR		1.79769313E+308		<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac002	pO2<29
----	---------------------------------	-----	--	-----------------	--	--------------------------	---	---------------------------------	--------

Formula: OUR.Transition1_value = PO2.Value <= liminf.Value

Description:

.....

13	Batch-Perfusio amb alimentac004	Transicio		1.79769313E+308		<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac004	perf<>0
----	---------------------------------	-----------	--	-----------------	--	--------------------------	---	---------------------------------	---------

Formula: Transicio.Transition2_value = perf.Value <> 0

Description:

.....

15	Formula qGlc	qGlc	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula qGlc	
----	--------------	------	-------	--	---	--------------------------	---	--------------	--

Formula: qGlc.Value = 190

Description:

.....

16	Formula iterar	iterar	Value		0	<input type="checkbox"/>	0	Formula iterar	
----	----------------	--------	-------	--	---	--------------------------	---	----------------	--

Formula: iterar.Value = 1

Description:

.....

Calculation Tag:		Result:				Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Title

Calculation type: On-line Calculation

17	Determinacio de la kdes003	FinalVARS		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes003	pO2>80
Formula:		FinalVARS.Transition1_value = PO2.Value >= (limsup.Value + 4)						
Description								
18	Batch-Perfusio amb alimentac005	RecuperaSETP		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac005	toper>3
Formula:		RecuperaSETP.Transition1_value = toper.Value >= temps.Value						
Description								
19	Batch-Perfusio amb alimentac006	FinalVARS		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac006	pO2>80
Formula:		FinalVARS.Transition1_value = PO2.Value >= (limsup.Value + 4)						
Description								
20	Batch-Perfusio amb alimentac007	Delay		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac007	iterar=1
Formula:		Delay.Transition1_value = iterar.Value = 1						
Description								
21	Batch-Perfusio amb alimentac008	Delay		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac008	iterar<>1
Formula:		Delay.Transition2_value = iterar.Value <> 1						
Description								
22	Determinacio de la kdes000	GFOV_Ctrl		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes000	pO2<56
Formula:		GFOV_Ctrl.Transition1_value = PO2.Value < limsup.Value						
Description								

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

24	Determinacio de la kdes002	RecuperaSETP		1.79789313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes002	toper>3
----	----------------------------	--------------	--	-----------------	--------------------------	---	----------------------------	---------

Formula: RecuperaSETP.Transition1_value = toper.Value >= temps.Value

Description

25	Formula perfusió	perf	Value	0	<input type="checkbox"/>	0	Formula perfusió	
----	------------------	------	-------	---	--------------------------	---	------------------	--

Formula: perf.Value = 0

Description

26	Determinacio de la kdes004	Delay1		1.79789313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes004	iterar=1
----	----------------------------	--------	--	-----------------	--------------------------	---	----------------------------	----------

Formula: Delay1.Transition1_value = iterar.Value = 1

Description

27	Determinacio de la kdes005	Delay1		1.79789313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes005	iterar<>1
----	----------------------------	--------	--	-----------------	--------------------------	---	----------------------------	-----------

Formula: Delay1.Transition2_value = iterar.Value <> 1

Description

28	Determinacio de la kdes006	SetpointsON		1.79789313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes006	pO2>56
----	----------------------------	-------------	--	-----------------	--------------------------	---	----------------------------	--------

Formula: SetpointsON.Transition1_value = PO2.Value >= limsup.Value

Description

32	Determinacio de la kdes001	LinialitzON		1.79789313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Determinacio de la kdes001	pO2<29
----	----------------------------	-------------	--	-----------------	--------------------------	---	----------------------------	--------

Formula: LinialitzON.Transition1_value = PO2.Value < liminf.Value

Description

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

42	Batch-Perfusio amb alimentac001	GFOV_Ctrl		1.79769313E+308	<input type="checkbox"/>	0	Batch-Perfusio amb alimentac001	pO2<56
----	---------------------------------	-----------	--	-----------------	--------------------------	---	---------------------------------	--------

Formula: $GFOV_Ctrl.Transition1_value = PO2.Value \leq \limsup.Value$

Description:

54	Formula temps	temps	Value	0	<input type="checkbox"/>	0	Formula temps	
----	---------------	-------	-------	---	--------------------------	---	---------------	--

Formula: $temps.Value = 3$

Description:

55	Formula OUR	OURcalc	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1	Formula OUR	
----	-------------	---------	-------	---	-------------------------------------	---	-------------	--

Formula: $OURcalc.Value = 0.00194 * ((pO2iniOUR.Value - PO2.Value) / (_BatchAge.Value - tiniOUR.Value) - (kdescalc.Value * pO2int.Value) / (_BatchAge.Value - tiniOUR.Value))$

Description:

56	Formula tinioper	tinioper	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1	Formula tinioper	
----	------------------	----------	-------	---	-------------------------------------	---	------------------	--

Formula: $tinioper.Value = (PO2.Value \geq \limsup.Value) * _BatchAge.Value + (PO2.Value < \limsup.Value) * tinioper.Value$

Description:

57	Formula toper	toper	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1	Formula toper	
----	---------------	-------	-------	---	-------------------------------------	---	---------------	--

Formula: $toper.Value = _BatchAge.Value - tinioper.Value$

Description:

59	Formula kdes	kdes	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1	Formula kdes	
----	--------------	------	-------	---	-------------------------------------	---	--------------	--

Formula: $kdes.Value = (contador.Value * \sum pO2t.Value - \sum t.Value * \sum pO2.Value) / (contador.Value * \sum t2.Value - \sum t.Value^2)$

Description: Càlcul de la constant de desorció

Apèndix

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

61	Formula muOUR_num	muOUR_num	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	1	Formula muOUR_num	
Formula:		$\text{muOUR_num.Value} = 4 * (\text{OUR_40.Value} * \text{tOUR_40.Value} + \text{OUR_30.Value} * \text{tOUR_30.Value} + \text{OUR_20.Value} * \text{tOUR_20.Value} + \text{OUR_10.Value} * \text{tOUR_10.Value}) - ((\text{tOUR_40.Value} + \text{tOUR_30.Value} + \text{tOUR_20.Value} + \text{tOUR_10.Value}) * (\text{OUR_40.Value} + \text{OUR_30.Value} + \text{OUR_20.Value} + \text{OUR_10.Value}))$						
Description:								

62	Formula tiniOUR	tiniOUR	Value	0	<input type="checkbox"/>	2	Formula tiniOUR	
Formula:		$\text{tiniOUR.Value} = (\text{PO2.Value} \geq (\text{limsup.Value} - 1)) * _ \text{BatchAge.Value} + (\text{PO2.Value} < (\text{limsup.Value} - 1)) * \text{tiniOUR.Value}$						
Description:								

63	Formula contador	contador	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2	Formula contador	
Formula:		$\text{contador.Value} = \text{contador.Value} + 1$						
Description:								

64	Formula tOUR_40	tOUR_40	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2	Formula tOUR_40	
Formula:		$\text{tOUR_40.Value} = \text{tOUR_30.Value}$						
Description:								

65	Formula pO2int	pO2int	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2	Formula pO2int	
Formula:		$\text{pO2int.Value} = \text{pO2int.Value} + ((_ \text{BatchAge.Value} - \text{tant.Value}) * (\text{pO2ant.Value} + \text{PO2.Value})) / 2$						
Description:								

67	Formula muOUR_den	muOUR_den	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	2	Formula muOUR_den	
Formula:		$\text{muOUR_den.Value} = 4 * (\text{tOUR_40.Value}^2 + \text{tOUR_30.Value}^2 + \text{tOUR_20.Value}^2 + \text{tOUR_10.Value}^2) - (\text{tOUR_40.Value} + \text{tOUR_30.Value} + \text{tOUR_20.Value} + \text{tOUR_10.Value})^2$						
Description:								

Calculation Tag:		Result:				Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Title

Calculation type: On-line Calculation

70	Formula tant	tant	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3	Formula tant
----	--------------	------	-------	---	-------------------------------------	---	--------------

Formula: tant.Value = _BatchAge.Value

Description	
-------------	--

71	Formula sumpO2	sumpO2	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3	Formula sumpO2
----	----------------	--------	-------	---	-------------------------------------	---	----------------

Formula: sumpO2.Value = sumpO2.Value + ln(PO2.Value)

Description	Càlcula el sumatori de ln(pO2) per determinar kdes.
-------------	---

72	Formula OUR_40	OUR_40	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3	Formula OUR_40
----	----------------	--------	-------	---	-------------------------------------	---	----------------

Formula: OUR_40.Value = OUR_30.Value

Description	
-------------	--

73	Formula muOUR	muOUR	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3	Formula muOUR
----	---------------	-------	-------	---	-------------------------------------	---	---------------

Formula: muOUR.Value = muOUR_num.Value / muOUR_den.Value

Description	
-------------	--

74	Formula pO2iniOUR	pO2iniOUR	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	3	Formula pO2iniOUR
----	-------------------	-----------	-------	---	-------------------------------------	---	-------------------

Formula: pO2iniOUR.Value = (PO2.Value >= (limsup.Value - 1)) * PO2.Value + (PO2.Value < (limsup.Value - 1)) * pO2iniOUR.Value

Description	
-------------	--

76	Formula pO2ant	pO2ant	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	4	Formula pO2ant
----	----------------	--------	-------	---	-------------------------------------	---	----------------

Formula: pO2ant.Value = PO2.Value

Description	
-------------	--

Calculation Tag:		Result:					Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Tag	Title

Calculation type: On-line Calculation

77	Formula sumt k1a	sumt	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	4	Formula sumt k1a	
----	------------------	------	-------	---	-------------------------------------	---	------------------	--

Formula: $sumt.Value = sumt.Value + _BatchAge.Value$

Description:

78	Formula sumt	sumt	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	4	Formula sumt	
----	--------------	------	-------	---	-------------------------------------	---	--------------	--

Formula: $sumt.Value = sumt.Value + _BatchAge.Value$

Description: Càlcul del sumatori de temps per determinar el pendent kdes

80	Formula tOUR_30	tOUR_30	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	4	Formula tOUR_30	
----	-----------------	---------	-------	---	-------------------------------------	---	-----------------	--

Formula: $tOUR_30.Value = tOUR_20.Value$

Description:

82	Formula Qadd	Qadd	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	4	Formula Qadd	
----	--------------	------	-------	---	-------------------------------------	---	--------------	--

Formula: $Qadd.Value = qGlc.Value * OURcalc.Value * \exp(\mu OUR.Value * temps.Value) * Vreac.Value / (60 * qO2.Value * (Glcalm.Value - Glcsp.Value))$

Description:

83	Formula numdades	numdades	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	5	Formula numdades	
----	------------------	----------	-------	---	-------------------------------------	---	------------------	--

Formula: $numdades.Value = ((_BatchAge.Value - tinikdes.Value) * 3600) / Shared_MFCSCalcCycle.Value + 1$

Description: Càlcul del nombre de dades per determinar el pendent kdes

86	Formula sumt2	sumt2	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	5	Formula sumt2	
----	---------------	-------	-------	---	-------------------------------------	---	---------------	--

Formula: $sumt2.Value = sumt2.Value + _BatchAge.Value ^ 2$

Description: Càlcul de la suma de temps al quadrat per determinar la kdes

Calculation Tag:		Result:				Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Title

Calculation type: On-line Calculation

87	Formula subsa setpoint	SUBSA	Setpoint	0	<input checked="" type="checkbox"/>	5	Formula subsa setpoint
----	------------------------	-------	----------	---	-------------------------------------	---	------------------------

Formula: $SUBSA.Setpoint = (Qadd.Value \geq 0.4) * 5.975 * Qadd.Value + (Qadd.Value < 0.4) * 2$

Description: Per evitar que a cabals menors de 0.4 mL/min la bomba no es mogui, s'afegeixen les condicions (Modif. 29/08/08).

89	Formula OUR_30	OUR_30	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	5	Formula OUR_30
----	----------------	--------	-------	---	-------------------------------------	---	----------------

Formula: $OUR_{30}.Value = OUR_{20}.Value$

Description:

92	Formula tOUR_20	tOUR_20	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	6	Formula tOUR_20
----	-----------------	---------	-------	---	-------------------------------------	---	-----------------

Formula: $tOUR_{20}.Value = tOUR_{10}.Value$

Description:

93	Formula sumapO2t	sumpO2t	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	6	Formula sumapO2t
----	------------------	---------	-------	---	-------------------------------------	---	------------------

Formula: $sumpO2t.Value = sumpO2t.Value + _BatchAge.Value * \ln(PO2.Value)$

Description: Càlcul sumatori pO2t per determinar pendent kdes

96	Formula OUR_20	OUR_20	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	7	Formula OUR_20
----	----------------	--------	-------	---	-------------------------------------	---	----------------

Formula: $OUR_{20}.Value = OUR_{10}.Value$

Description:

97	Formula tOUR_10	tOUR_10	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	8	Formula tOUR_10
----	-----------------	---------	-------	---	-------------------------------------	---	-----------------

Formula: $tOUR_{10}.Value = _BatchAge.Value$

Description:

Calculation Tag:		Result:				Formula:	
No.	Variable Tag	Tag	Property	Initial Value	Skip if INVALID	Order	Title

Calculation type: On-line Calculation

98	Formula OUR_10	OUR_10	Value	0	<input checked="" type="checkbox"/>	9	Formula OUR_10
Formula:		OUR_10.Value = ln(OURcalc.Value)					
Description							

10.2. Informes d'avaluació econòmica

10.2.1. Bioprocés convencional: estratègia en discontinu

A.	Direct Fixed Capital	131,768,000 €
B.	Working Capital	8,032,000 €
C.	Startup Cost	6,588,000 €
D.	Up-Front R&D	400,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
Total Investment (A+B+C+D+E)		146,788,000 €

Capital Investment Charged to This Project	146,788,000 €
Operating Cost	100,494,000 €/yr
Unit Production Cost	403,614.46 €/g MP
Total Revenues	300,000,000 €/yr
Gross Margin	66.5 %
Return On Investment	97.8 %
Payback Time	1.02 years
IRR (After Taxes)	115.4 %

MP = Flow of Component Adenovirus in Stream S-131

10.2.1.1. Major equipment specification and FOB cost (2009 prices)

10.2.1.1.1. Producció

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 1.53 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	G-101	Centrifugal Compressor Power = 0.04 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-101	Air Filter Rated Throughput = 83.36 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 463.66 L/h	9,000	9,000
2 / 0 / 0	V-101	Seed Fermentor Vessel Volume = 100.00 L	600,000	1,200,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 15.34 m2	70,000	70,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 37.41 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 74755.08 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 415379.10 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 16990.02 L	339,000	339,000
2 / 0 / 0	V-104	Fermentor Vessel Volume = 8000.00 L	1,050,000	2,100,000
1 / 0 / 0	DE-103	Dead-End Filter Filter Area = 6.43 m2	36,000	36,000
1 / 0 / 0	V-107	Receiver Tank Vessel Volume = 212.24 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	V-108	Receiver Tank Vessel Volume = 13069.21 L	118,000	118,000
1 / 0 / 0	V-109	Receiver Tank Vessel Volume = 1787.24 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	DE-104	Dead-End Filter Filter Area = 6.64 m2	36,000	36,000
1 / 0 / 0	G-103	Centrifugal Compressor Power = 0.08 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-105	Air Filter Rated Throughput = 156.30 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	AF-106	Air Filter Rated Throughput = 878.72 L/h	9,000	9,000
2 / 0 / 0	V-102	Seed Fermentor Vessel Volume = 1000.00 L	783,000	1,566,000
1 / 0 / 0	V-103	Receiver Tank Vessel Volume = 1843.09 L	61,000	61,000
		Unlisted Equipment		1,498,000
			TOTAL	7,491,000

10.2.1.1.2. Purificació

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
2 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 161239.69 m2	570,000	1,140,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 2537.31 L/h	55,000	55,000
3 / 0 / 0	UF-101	Ultrafilter Membrane Area = 56.90 m2	143,000	429,000
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 1692.88 L	250,000	250,000
1 / 0 / 0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 19.06 m2	76,000	76,000
1 / 0 / 0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 113.10 L	236,000	236,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 8329.79 L	313,000	313,000
2 / 0 / 0	UF-102	Ultrafilter Membrane Area = 45.92 m2	129,000	258,000
12 / 0 / 0	C-102	GFL Chromatography Column Column Volume = 100.53 L	234,000	2,808,000
1 / 0 / 0	UF-103	Ultrafilter Membrane Area = 2.87 m2	34,000	34,000
1 / 0 / 0	V-104	Blending Tank Vessel Volume = 283.76 L	195,000	195,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 15.17 m2	69,000	69,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 1698.83 L	250,000	250,000
1 / 0 / 0	V-101	Blending Tank Vessel Volume = 16860.18 L	338,000	338,000
		Unlisted Equipment		1,613,000
		TOTAL		8,064,000

10.2.1.2. Fixed capital estimate summary (2009 prices)

10.2.1.2.1. Producció

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	7,491,000
2. Installation	2,644,000
3. Process Piping	3,371,000
4. Instrumentation	2,997,000
5. Insulation	225,000
6. Electrical	1,124,000
7. Buildings	11,237,000
8. Yard Improvement	1,124,000
9. Auxiliary Facilities	4,495,000
TPDC	34,707,000
3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	8,677,000
11. Construction	12,147,000
TPIC	20,824,000
3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	55,531,000
3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	2,777,000
13. Contingency	5,553,000
CFC = 12+13	8,330,000
3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	63,861,000

10.2.1.2.2. Purificació

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	8,064,000
2. Installation	2,393,000
3. Process Piping	3,629,000
4. Instrumentation	3,226,000
5. Insulation	242,000
6. Electrical	1,210,000
7. Buildings	12,096,000
8. Yard Improvement	1,210,000
9. Auxiliary Facilities	4,838,000
TPDC	36,906,000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	9,226,000
11. Construction	12,917,000
TPIC	22,143,000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	59,049,000

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	2,952,000
13. Contingency	5,905,000
CFC = 12+13	8,857,000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	67,907,000

10.2.1.3. Labor cost – process summary (2009 prices)

10.2.1.3.1. Producció

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	35,915	3,469,414	100.00
TOTAL		35,915	3,469,414	100.00

10.2.1.3.2. Purificació

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	5,686	549,226	100.00
TOTAL		5,686	549,226	100.00

10.2.1.4. Raw materials cost – process summary (2009 prices)

10.2.1.4.1. Producció

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Air	0.000	2,904,597	0	0.00
Biomass	0.000	0	0	0.00
HCl (1 M)	0.005	190,267	962	0.00
NaOH (0.5 M)	0.098	192,339	18,849	0.03
WFI	0.140	374,770	52,468	0.09
Adenovirus	0.000	0	0	0.00
SF Medium	100.000	605,600	60,560,000	99.88
TOTAL		4,267,573	60,632,279	100.00

10.2.1.4.2. Purificació

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
HCl (1 M)	0.005	213,498	1,079	0.33
NaOH (0.5 M)	0.098	215,824	21,151	6.56
WFI	0.140	833,982	116,757	36.19
Benzonase	1,000,000.000	0	120,000	37.19
Buffer A	0.136	168,526	22,926	7.11
Buffer B	0.128	198,917	25,462	7.89
NaOH (0.1M)	0.159	54,236	8,647	2.68
Buffer C	0.135	48,938	6,602	2.05
TOTAL		1,733,921	322,624	100.00

10.2.1.5. Various consumables cost – process summary (2009 prices)

10.2.1.5.1. Producció

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	1,400,000	160 Item	224,000	100.00
TOTAL			224,000	100.00

10.2.1.5.2. Purificació

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft Membrane	560,000	763 m2	427,044	2.24
Dft PBA Chrom Resin	2,100,000	905 L	1,900,035	9.95
Dft DEF Cartridge	1,400,000	40 Item	56,000	0.29
UF Membrane (Biotech)	1,120,000	10,617 m2	11,890,740	62.26
Gel Filtration Resin	1,000,000	4,825 L	4,825,486	25.27
TOTAL			19,099,305	100.00

10.2.1.6. Annual operating cost – process summary (2009 prices)

10.2.1.6.1. Producció

Cost Item	€	%
Raw Materials	60,632,000	84.98
Labor-Dependent	3,469,000	4.86
Facility-Dependent	6,386,000	8.95
Laboratory/QC/QA	520,000	0.73
Consumables	224,000	0.31
Waste Treatment/Disposal	0	0.00
Utilities	116,000	0.16
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	71,348,000	100.00

10.2.1.6.2. Purificació

Cost Item	€	%
Raw Materials	323,000	1.11
Labor-Dependent	549,000	1.88
Facility-Dependent	6,791,000	23.30
Laboratory/QC/QA	82,000	0.28
Consumables	19,099,000	65.53
Waste Treatment/Disposal	2,293,000	7.87
Utilities	10,000	0.03
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	29,146,000	100.00

10.2.2. Bioprocés convencional: estratègia en continu amb perfusió

A.	Direct Fixed Capital	43,425,000 €
B.	Working Capital	1,428,000 €
C.	Startup Cost	2,171,000 €
D.	Up-Front R&D	400,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
Total Investment (A+B+C+D+E)		47,424,000 €

Capital Investment Charged to This Project	47,424,000 €
Operating Cost	12,771,490 €/yr
Unit Production Cost	51,405.62 €/g MP
Total Revenues	300,000,000 €/yr
Gross Margin	95.7 %
Return On Investment	426.9 %
Payback Time	0.23 years
IRR (After Taxes)	575.8 %
MP = Flow of Component Adenovirus in Stream S-131	

10.2.2.1. Major equipment specification and FOB cost (2009 prices)

10.2.2.1.1. Producció

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 0.36 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 463.25 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	V-101	Seed Fermentor Vessel Volume = 50.00 L	600,000	600,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 16.88 m2	75,000	75,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 0.79 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 1576.81 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 9194.91 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 403.96 L	204,000	204,000
1 / 0 / 0	V-104	Fermentor Vessel Volume = 400.00 L	689,000	689,000
1 / 0 / 0	DE-103	Dead-End Filter Filter Area = 0.02 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DE-104	Dead-End Filter Filter Area = 0.02 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	V-107	Receiver Tank Vessel Volume = 1074.16 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	V-109	Receiver Tank Vessel Volume = 50.27 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	V-102	Receiver Tank Vessel Volume = 351.86 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	V-103	Receiver Tank Vessel Volume = 266.67 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	V-106	Receiver Tank Vessel Volume = 800.00 L	61,000	61,000
1 / 0 / 0	G-103	Centrifugal Compressor Power = 0.04 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-105	Air Filter Rated Throughput = 83.36 L/h	9,000	9,000
		Unlisted Equipment		543,000
		TOTAL		2,716,000

10.2.2.1.2. Purificació

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 7667.39 m ²	134,000	134,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 361.97 L/h	28,000	28,000
1 / 0 / 0	UF-101	Ultrafilter Membrane Area = 3.99 m ²	34,000	34,000
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 39.42 L	178,000	178,000
1 / 0 / 0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 0.44 m ²	34,000	34,000
1 / 0 / 0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 113.10 L	236,000	236,000
1 / 0 / 0	UF-102	Ultrafilter Membrane Area = 2.01 m ²	34,000	34,000
2 / 0 / 0	C-102	GFL Chromatography Column Column Volume = 100.53 L	234,000	468,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.35 m ²	30,000	30,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 39.56 L	178,000	178,000
1 / 0 / 0	V-101	Blending Tank Vessel Volume = 393.61 L	204,000	204,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 198.65 L	185,000	185,000
1 / 0 / 0	V-104	Blending Tank Vessel Volume = 36.04 L	178,000	178,000
		Unlisted Equipment		480,000
		TOTAL		2,401,000

10.2.2.2. Fixed capital estimate summary (2009 prices)

10.2.2.2.1. Producció

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	2,716,000
2. Installation	999,000
3. Process Piping	1,222,000
4. Instrumentation	1,087,000
5. Insulation	81,000
6. Electrical	407,000
7. Buildings	4,074,000
8. Yard Improvement	407,000
9. Auxiliary Facilities	1,630,000
TPDC	12,624,000
3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	3,156,000
11. Construction	4,418,000
TPIC	7,574,000
3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	20,199,000
3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	1,010,000
13. Contingency	2,020,000
CFC = 12+13	3,030,000
3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	23,228,000

10.2.2.2. Purificació

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	2,401,000
2. Installation	699,000
3. Process Piping	1,081,000
4. Instrumentation	961,000
5. Insulation	72,000
6. Electrical	360,000
7. Buildings	3,602,000
8. Yard Improvement	360,000
9. Auxiliary Facilities	1,441,000
TPDC	10,977,000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	2,744,000
11. Construction	3,842,000
TPIC	6,586,000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	17,563,000

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	878,000
13. Contingency	1,756,000
CFC = 12+13	2,634,000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	20,197,000

10.2.2.3. Labor cost – process summary (2009 prices)

10.2.2.3.1. Producció

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	21,555	2,082,225	100.00
TOTAL		21,555	2,082,225	100.00

10.2.2.3.2. Purificació

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	2,001	193,254	100.00
TOTAL		2,001	193,254	100.00

10.2.2.4. Raw materials cost – process summary (2009 prices)

10.2.2.4.1. Producció

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Biomass	0.000	0	0	0.00
HCl (1 M)	0.005	24,014	121	0.00
NaOH (0.5 M)	0.098	24,275	2,379	0.07
WFI	0.140	47,300	6,622	0.19
Air	0.000	74,844	0	0.00
Adenovirus	0.000	0	0	0.00
SF Medium	100.000	34,188	3,418,782	99.73
TOTAL		204,621	3,427,904	100.00

10.2.2.4.2. Purificació

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
HCl (1 M)	0.005	56,566	286	0.24
NaOH (0.5 M)	0.098	57,182	5,604	4.63
WFI	0.140	250,576	35,081	28.96
Benzonase	1,000,000.000	0	78,000	64.39
Buffer A	0.136	2,590	352	0.29
Buffer B	0.128	3,083	395	0.33
NaOH (0.1M)	0.159	8,135	1,297	1.07
Buffer C	0.135	848	114	0.09
TOTAL		378,980	121,129	100.00

10.2.2.5. Various consumables cost – process summary (2009 prices)

10.2.2.5.1. Producció

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	1,400,000	104	Item	145,600	74.35
MF Membrane (Biotech)	840,000	60	m2	50,232	25.65
TOTAL				195,832	100.00

10.2.2.5.2. Purificació

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft Membrane	560,000	12	m2	6,464	0.33
Dft PBA Chrom Resin	2,100,000	588	L	1,235,023	62.52
Dft DEF Cartridge	1,400,000	26	Item	36,400	1.84
UF Membrane (Biotech)	1,120,000	156	m2	174,621	8.84
Gel Filtration Resin	1,000,000	523	L	522,761	26.47
TOTAL				1,975,269	100.00

10.2.2.6. Annual operating cost – process summary (2009 prices)

10.2.2.6.1. Producció

Cost Item	€	%
Raw Materials	3,428,000	41.07
Labor-Dependent	2,082,000	24.95
Facility-Dependent	2,323,000	27.83
Laboratory/QC/QA	312,000	3.74
Consumables	196,000	2.35
Waste Treatment/Disposal	0	0.00
Utilities	6,000	0.07
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	8,347,000	100.00

10.2.2.6.2. Purificació

Cost Item	€	%
Raw Materials	121,000	2.74
Labor-Dependent	193,000	4.37
Facility-Dependent	2,020,000	45.64
Laboratory/QC/QA	29,000	0.66
Consumables	1,975,000	44.64
Waste Treatment/Disposal	86,000	1.95
Utilities	0	0.01
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	4,425,000	100.00

10.2.3. Bioprocés no convencional: estratègia en discontinu

A.	Direct Fixed Capital	62,290,000 €
B.	Working Capital	3,935,000 €
C.	Startup Cost	1,558,000 €
D.	Up-Front R&D	400,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
Total Investment (A+B+C+D+E)		68,183,000 €

Capital Investment Charged to This Project	68,183,000 €
Operating Cost	85,466,000 €/yr
Unit Production Cost	343,373.49 €/g MP
Total Revenues	300,000,000 €/yr
Gross Margin	71.5 %
Return On Investment	222.9 %
Payback Time	0.45 years
IRR (After Taxes)	287.7 %

MP = Flow of Component Adenovirus In Stream S-131

10.2.3.1. Major equipment specification and FOB cost (2009 prices)

10.2.3.1.1. Producció

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 0.39 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 16.88 m2	75,000	75,000
1 / 0 / 0	DE-103	Dead-End Filter Filter Area = 2.01 m2	30,000	30,000
9 / 0 / 0	BBS-101	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 1000.00 L	280,000	2,520,000
1 / 0 / 0	G-101	Centrifugal Compressor Power = 0.13 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-101	Air Filter Rated Throughput = 257.35 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	BBS-102	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 100.00 L	70,000	70,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 10.87 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 21732.72 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	DCS-101	Disposable Container Skid Container Volume = 100.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-102	Disposable Container Skid Container Volume = 4000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-103	Disposable Container Skid Container Volume = 1000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-104	Disposable Container Skid Container Volume = 5000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DE-104	Dead-End Filter Filter Area = 22.36 m2	96,000	96,000
1 / 0 / 0	G-103	Centrifugal Compressor Power = 1.32 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 2643.17 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	BBS-103	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 1000.00 L	280,000	280,000
1 / 0 / 0	DCS-105	Disposable Container Skid Container Volume = 1000.00 L	0	0
		Unlisted Equipment		848,000
		TOTAL		4,238,000

10.2.3.1.2. Purificació

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 94647.01 m2	428,000	428,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 1117.04 L/h	38,000	38,000
1 / 0 / 0	UF-101	Ultrafilter Membrane Area = 50.00 m2	136,000	136,000
1 / 0 / 0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 5.58 m2	37,000	37,000
1 / 0 / 0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 113.10 L	236,000	236,000
1 / 0 / 0	UF-102	Ultrafilter Membrane Area = 26.02 m2	92,000	92,000
10 / 0 / 0	C-102	GFL Chromatography Column Column Volume = 100.53 L	234,000	2,340,000
1 / 0 / 0	UF-103	Ultrafilter Membrane Area = 2.17 m2	34,000	34,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 4.44 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DCS-102	Disposable Container Skid Container Volume = 1000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-103	Disposable Container Skid Container Volume = 1000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-104	Disposable Container Skid Container Volume = 300.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-105	Disposable Container Skid Container Volume = 3000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-101	Disposable Container Skid Container Volume = 6000.00 L	0	0
		Unlisted Equipment		843,000
		TOTAL		4,214,000

10.2.3.2. Fixed capital estimate summary (2009 prices)

10.2.3.2.1. Producció

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	4,238,000
2. Installation	4,989,000
3. Process Piping	1,271,000
4. Instrumentation	848,000
5. Insulation	85,000
6. Electrical	424,000
7. Buildings	6,357,000
8. Yard Improvement	636,000
9. Auxiliary Facilities	1,271,000
TPDC	20,119,000
3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	4,024,000
11. Construction	6,036,000
TPIC	10,060,000
3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	30,179,000
3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	1,509,000
13. Contingency	3,018,000
CFC = 12+13	4,527,000
3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	34,706,000

10.2.3.2.2. Purificació

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	4,214,000
2. Installation	948,000
3. Process Piping	1,264,000
4. Instrumentation	843,000
5. Insulation	84,000
6. Electrical	421,000
7. Buildings	6,321,000
8. Yard Improvement	632,000
9. Auxiliary Facilities	1,264,000
TPDC	15,991,000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	3,198,000
11. Construction	4,797,000
TPIC	7,995,000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	23,986,000

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	1,199,000
13. Contingency	2,399,000
CFC = 12+13	3,598,000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	27,584,000

10.2.3.3. Labor cost – process summary (2009 prices)

10.2.3.3.1. Producció

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	33,293	3,216,108	100.00
TOTAL		33,293	3,216,108	100.00

10.2.3.3.2. Purificació

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	3,518	339,814	100.00
TOTAL		3,518	339,814	100.00

10.2.3.4. Raw materials cost – process summary (2009 prices)

10.2.3.4.1. Producció

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Adenovirus	0.000	0	0	0.00
Air	0.000	1,096,331	0	0.00
Biomass	0.000	0	0	0.00
SF Medium	100.000	182,163	18,216,300	100.00
TOTAL		1,278,494	18,216,300	100.00

10.2.3.4.2. Purificació

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Water	0.000	326,263	0	0.00
Buffer A	0.136	50,528	6,874	4.34
WFI	0.140	109,673	15,354	9.69
Buffer B	0.128	59,599	7,629	4.81
Buffer C	0.135	41,801	5,639	3.56
Benzonase	1,000,000.000	0	123,000	77.60
TOTAL		587,865	158,496	100.00

10.2.3.5. Various consumables cost – process summary (2009 prices)

10.2.3.5.1. Producció

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	1,400,000	164	Item	229,600	26.02
1000 L Cell Bag	1,100,000	410	Item	451,000	51.12
100 L Cell Bag	420,000	41	Item	17,220	1.95
1000L Plastic Bag	400,000	451	Item	180,400	20.45
100L Plastic Bag	100,000	41	Item	4,100	0.46
TOTAL				882,320	100.00

10.2.3.5.2. Purificació

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft Membrane	560,000	229	m2	128,196	0.23
Dft PBA Chrom Resin	2,100,000	4,637	L	9,737,680	17.72
Dft DEF Cartridge	1,400,000	41	Item	57,400	0.10
UF Membrane (Biotech)	1,120,000	3,206	m2	3,590,547	6.53
1000L Plastic Bag	400,000	369	Item	147,600	0.27
500L Plastic Bag	350,000	164	Item	57,400	0.10
100L Plastic Bag	100,000	123	Item	12,300	0.02
Gel Filtration Resin	1,000,000	41,218	L	41,217,695	75.01
TOTAL				54,948,819	100.00

10.2.3.6. Annual operating cost – process summary (2009 prices)

10.2.3.6.1. Producció

Cost Item	€	%
Raw Materials	18,216,000	69.23
Labor-Dependent	3,216,000	12.22
Facility-Dependent	3,471,000	13.19
Laboratory/QC/QA	482,000	1.83
Consumables	882,000	3.35
Waste Treatment/Disposal	6,000	0.02
Utilities	40,000	0.15
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	26,314,000	100.00

10.2.3.6.2. Purificació

Cost Item	€	%
Raw Materials	158,000	0.27
Labor-Dependent	340,000	0.57
Facility-Dependent	2,758,000	4.66
Laboratory/QC/QA	51,000	0.09
Consumables	54,949,000	92.90
Waste Treatment/Disposal	890,000	1.51
Utilities	3,000	0.00
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	59,150,000	100.00

10.2.4. Bioprocés no convencional: estratègia en continu amb perfusió

A.	Direct Fixed Capital	12,326,000 €
B.	Working Capital	1,413,000 €
C.	Startup Cost	308,000 €
D.	Up-Front R&D	400,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
Total Investment (A+B+C+D+E)		14,447,000 €

Capital Investment Charged to This Project	14,447,000 €
Operating Cost	17,280,431 €/yr
Unit Production Cost	69,477.91 €/g MP
Total Revenues	300,000,000 €/yr
Gross Margin	94.2 %
Return On Investment	1,367.3 %
Payback Time	0.07 years
IRR (After Taxes)	1,913.5 %

MP = Flow of Component Adenovirus In Stream S-131

10.2.4.1. Major equipment specification and FOB cost (2009 prices)

10.2.4.1.1. Producció

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 0.16 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 23.39 m2	100,000	100,000
1 / 0 / 0	DE-103	Dead-End Filter Filter Area = 0.02 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	BBS-101	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 500.00 L	200,000	200,000
1 / 0 / 0	G-101	Centrifugal Compressor Power = 0.06 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-101	Air Filter Rated Throughput = 123.31 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	BBS-102	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 50.00 L	50,000	50,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 0.54 kW	88,000	88,000
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 1077.49 L/h	9,000	9,000
1 / 0 / 0	DCS-101	Disposable Container Skid Container Volume = 50.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-102	Disposable Container Skid Container Volume = 500.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-103	Disposable Container Skid Container Volume = 500.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-104	Disposable Container Skid Container Volume = 500.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DE-104	Dead-End Filter Filter Area = 0.02 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DCS-105	Disposable Container Skid Container Volume = 1000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-106	Disposable Container Skid Container Volume = 2000.00 L	0	0
1 / 0 / 0	MX-103	Mixer Size/Capacity = 1476.05 kg/h Unlisted Equipment	0	0
			TOTAL	791,000

10.2.4.1.2. Purificació

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 6985.98 m2	134,000	134,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 494.70 L/h	28,000	28,000
1 / 0 / 0	UF-101	Ultrafilter Membrane Area = 2.73 m2	34,000	34,000
1 / 0 / 0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 0.41 m2	34,000	34,000
1 / 0 / 0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 113.10 L	236,000	236,000
1 / 0 / 0	UF-102	Ultrafilter Membrane Area = 1.43 m2	34,000	34,000
1 / 0 / 0	C-102	GFL Chromatography Column Column Volume = 100.53 L	234,000	234,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.32 m2	30,000	30,000
1 / 0 / 0	DCS-102	Disposable Container Skid Container Volume = 50.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-103	Disposable Container Skid Container Volume = 50.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-105	Disposable Container Skid Container Volume = 200.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-101	Disposable Container Skid Container Volume = 500.00 L	0	0
1 / 0 / 0	DCS-104	Disposable Container Skid Container Volume = 50.00 L	0	0
		Unlisted Equipment		191,000
		TOTAL		955,000

10.2.4.2. Fixed capital estimate summary (2009 prices)

10.2.4.2.1. Producció

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	791,000
2. Installation	646,000
3. Process Piping	237,000
4. Instrumentation	158,000
5. Insulation	16,000
6. Electrical	79,000
7. Buildings	1,187,000
8. Yard Improvement	119,000
9. Auxiliary Facilities	237,000
TPDC	3,470,000
3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	694,000
11. Construction	1,041,000
TPIC	1,735,000
3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	5,206,000
3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	260,000
13. Contingency	521,000
CFC = 12+13	781,000
3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	5,986,000

10.2.4.2.2. Purificació

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	955,000
2. Installation	266,000
3. Process Piping	287,000
4. Instrumentation	191,000
5. Insulation	19,000
6. Electrical	96,000
7. Buildings	1,433,000
8. Yard Improvement	143,000
9. Auxiliary Facilities	287,000
TPDC	3,675,000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)	
10. Engineering	735,000
11. Construction	1,103,000
TPIC	1,838,000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)	
TPC	5,513,000

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)	
12. Contractor's Fee	276,000
13. Contingency	551,000
CFC = 12+13	827,000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)	
DFC	6,340,000

10.2.4.3. Labor cost – process summary (2009 prices)

10.2.4.3.1. Producció

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	21,498	2,076,724	100.00
TOTAL		21,498	2,076,724	100.00

10.2.4.3.2. Purificació

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	96.60	1,335	128,984	100.00
TOTAL		1,335	128,984	100.00

10.2.4.4. Raw materials cost – process summary (2009 prices)

10.2.4.4.1. Producció

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Adenovirus	0.000	0	0	0.00
Air	0.000	57,306	0	0.00
Biomass	0.000	0	0	0.00
SF Medium	100.000	33,626	3,362,565	100.00
TOTAL		90,931	3,362,565	100.00

10.2.4.4.2. Purificació

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
HCl (1 M)	0.005	28,280	143	0.16
NaOH (0.5 M)	0.098	28,588	2,802	3.07
Water	0.000	167,110	0	0.00
Buffer A	0.136	1,956	266	0.29
WFI	0.140	24,500	3,430	3.76
Buffer B	0.128	2,356	302	0.33
Buffer C	0.135	2,855	385	0.42
Benzonase	1,000,000.000	0	84,000	91.98
TOTAL		255,645	91,327	100.00

10.2.4.5. Various consumables cost – process summary (2009 prices)

10.2.4.5.1. Producció

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	1,400,000	112	Item	156,800	50.82
MF Membrane (Biotech)	840,000	56	m2	47,040	15.25
50 L Plastic Bag	30,000	28	Item	840	0.27
500L Plastic Bag	350,000	140	Item	49,000	15.88
500 L Cell Bag	880,000	28	Item	24,640	7.99
1000L Plastic Bag	400,000	56	Item	22,400	7.26
50 L Cell Bag	280,000	28	Item	7,840	2.54
TOTAL				308,560	100.00

10.2.4.5.2. Purificació

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount		Annual Cost (€)	%
Dft Membrane	560,000	11	m2	6,368	0.07
Dft PBA Chrom Resin	2,100,000	3,167	L	6,650,123	68.85
Dft DEF Cartridge	1,400,000	28	Item	39,200	0.41
UF Membrane (Biotech)	1,120,000	117	m2	130,501	1.35
50 L Plastic Bag	30,000	84	Item	2,520	0.03
500L Plastic Bag	350,000	28	Item	9,800	0.10
100L Plastic Bag	100,000	56	Item	5,600	0.06
Gel Filtration Resin	1,000,000	2,815	L	2,814,867	29.14
TOTAL				9,658,979	100.00

10.2.4.6. Annual operating cost – process summary (2009 prices)

10.2.4.6.1. Producció

Cost Item	€	%
Raw Materials	3,363,000	50.46
Labor-Dependent	2,077,000	31.16
Facility-Dependent	599,000	8.98
Laboratory/QC/QA	312,000	4.67
Consumables	309,000	4.63
Waste Treatment/Disposal	1,000	0.02
Utilities	5,000	0.07
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	6,664,000	100.00

10.2.4.6.2. Purificació

Cost Item	€	%
Raw Materials	91,000	0.86
Labor-Dependent	129,000	1.22
Facility-Dependent	634,000	5.98
Laboratory/QC/QA	19,000	0.18
Consumables	9,659,000	91.04
Waste Treatment/Disposal	76,000	0.72
Utilities	0	0.00
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	10,609,000	100.00

