

# ANÀLISI D'ALTERNATIVES PER A UN BIOPROCÉS DE PRODUCCIÓ D'UNA VACUNA ANIMAL

Memòria per optar  
al grau de Doctor de  
Martí Lecina i Veciana  
Juny de 2007



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

**ANÀLISI D'ALTERNATIVES PER UN BIOPROCÉS DE  
PRODUCCIÓ D'UNA VACUNA ANIMAL.**

Programa de doctorat en Biotecnologia.  
Departament d'Enginyeria Química.

**MARTÍ LECINA i VECIANA**

Bellaterra, juny de 2007

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 Martí Lecina i Veciana ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol de: **Anàlisi d'alternatives per a un bioprocés de producció d'una vacuna animal**, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Biotecnologia.

I perquè en prengueu 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

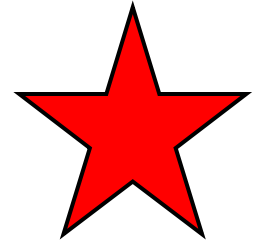
Bellaterra, abril de 2007

Francesc Gòdia i Casablanca

Jordi Joan Cairó i Badillo



Sorprenentment l'apartat que és més llegit i que crea més expectació de tota una tesi és l'apartat d'agraïments, potser donat per la proximitat o pertinença a la societat hispànica on la xafarderia està en l'ordre del dia. Contràriament el més recomanable és obrir les tesis pel Resum.



No obstant, no puc deixar d'expressar el més profund agraïment a tota aquella gent que ha estat involucrada, i que ha participat en el procés de realització d'aquesta tesi, la que conformarien una llarga llista. També vull agrair a totes les persones amb les que he tingut el plaer de compartir un bocí d'aquesta aventura que és la vida, ja que hom és un mateix, més tota la gent que l'envolta, especialment a la família i als amics. Per tant, tota aquesta gent amb qui he tingut el plaer, tinc el plaer, i espero de continuar tenint-lo, us haig de dir que us sento part de mi, i que us tinc una profunda estima.



Vull agrair especialment la confiança i l'oportunitat que els directors d'aquesta tesi m'han ofert en Jordi Joan Cairó i en Francesc Gòdia (que excepcionalment cito els noms), i especialment, per no haver fet cas de les recomanacions que ho desaconsellaven. He pogut comprovar com es reproduïxen, encara avui en dia llegendes escoceses de temps antics.



Finalment voldria transcriure uns fragments de Miquel Martí i Pol, a qui continuo admirant.





“...Escasseja el diner  
i ja és sabut que els poderosos  
només poden permetre's  
certes efusions sentimentals  
amb la butxaca plena.



A coll-i-be dels pobres  
alternen xurriaca i caramel  
segons el vent que bufa;  
però no descavalquen mai.



Miquel, recorda-ho:  
únicament pegant sacsades  
tots plegats,  
ens els traurem de sobre.



Les canyes

només es tronon llances  
si hom les empunya amb esperit de lluita...”



“...Ara el que cal és que tot recomenci:  
la veu i el gest

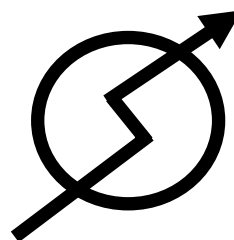


on no hi ha veu ni gest,  
els camins que no menen enlloc  
i la incertesa del vent,

el que encara no hem dit  
i el que encara no hem pensat,  
el que voldríem i el que no voldríem,  
el que és bell i llunyà  
i el que és pròxim i obscur.



Ara el que cal és que tot recomenci,  
ben certament:  
el que més cal  
és l'esforç de recomençar  
un cop més encara.”



AcetilCoA	Acetil conenzim A
ADN	Àcid desoxiribonucleic.
AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfat.
BSA	Albúmina.
CADC	Cultiu d'alta densitat cel·lular.
$C^*$	Concentració d'oxigen saturat en el medi de cultiu.
$C_{O_2}^*$	Concentració d'oxigen dissolt en equilibri en la fase gas, mM.
$C_{O_2}(t)$	Concentració d'oxigen dissolt en qualsevol temps, mM.
$C_{O_2}(t_f)$	Concentració d'oxigen dissolt per al temps final, mM.
$C_{O_2}(t_0)$	Concentració d'oxigen dissolt per al temps inicial, mM.
$C_p$	Concentració del component estudiat, mM.
$C_{p_0}$	Concentració inicial del component $C_p$ a temps igual a zero, mM.
d	Dilució amb tripà de blau.
DCU	Unitat de control digital.
DMSO	Dimetilsulfòxid.
DO	Densitat òptica.
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic.
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay.</i>
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FBS	Sèrum fetal boví.
FCS	Sèrum fetal de vedella.
FIA	Anàlisi per injecció de flux.
GC	Consum de glucosa acumulada, mM.
Glc	Glucosa.
[Glc]	Concentració de glucosa al bioreactor, mM.
$Glc_{add,i}$	Concentració de glucosa a addicionar pel sistema de control en la següent actuació, mM.
$Glc_{add,i-1}$	Concentració de glucosa addicionada pel sistema de control en l'anterior actuació, mM.
$Glc_{aliment}$	Composició de la glucosa en la solució d'addició, mM.
$Glc_0$	Composició de la glucosa en la solució d'addició, mM.
$Glc_{cons,i}$	Concentració de glucosa consumida en l'interval de temps anterior, mM.
$Glc_{inicial}$	Concentració de glucosa inicial al medi de cultiu, mM. temps anterior, mM.
$Glc_{pred,i}$	Concentració de glucosa consumida en el pròxim interval de temps, mM.
$Glc_{r,i}$	Concentració de glucosa al bioreactor en el temps actual, mM.
$Glc_{r,i-1}$	Concentració de glucosa al reactor en el temps anterior, mM.
$Glc_{sortida}$	Concentració de glucosa en el medi exhaurit de la perfusió, mM.
$Glc_{sp}$	Punt de consigna de la concentració de glucosa, mM.

GOD	Glucosa oxidasa.
G3P	Glucosa 3-fosfat
His	Histidina.
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography.</i>
IBDV	<i>Infectal Bursal Disease Virus</i>
ICV	Integral de cèl·lules viables, cel·h/ml.
$K_{des}$	Coefficient volumètric de desorció de l'oxigen en el medi de cultiu, $h^{-1}$ .
$k_{dh}$	Velocitat específica de creixement calculada a partir de la mesura d'OUR. ( $h^{-1}$ )
$K_{La}$	Coefficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen, $h^{-1}$ .
m	Nombre de camps comptats a l'hemacitòmetre.
$m_{sx}$	Coefficient de manteniment cel·lular.
MEMG	<i>Glasgow Modified Eagle Medium.</i>
MOI	Multiplicitat d'infecció (virus/cèl·lula)
$n_1, n_2$	Valor del recompte de cèl·lules en un camp de l'hemacitòmetre.
NAD/NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma oxidada/reduïda).
OAA	Oxal acetat
OC	Consum d'oxigen acumulat, mM.
$OC_i$	Consum d'oxigen acumulat entre el temps actual i l'anterior, mM.
$OC_{i+1}$	Consum d'oxigen acumulat entre el temps projectat i l'actual, mM.
ORF	Fase oberta de lectura.
OUR	Velocitat del consum d'oxigen, $mmol/(l \cdot h)$ .
$OUR_0$	Velocitat del consum d'oxigen a temps inicial, $mmol/(l \cdot h)$ .
$OUR_i$	Velocitat del consum d'oxigen actual, $mmol/(l \cdot h)$ .
$OUR_{i-1}$	Velocitat del consum d'oxigen anterior, $mmol/(l \cdot h)$ .
$OUR_{max}$	Valor màxim de la velocitat del consum d'oxigen, $mmol/(l \cdot h)$ .
p/v	Relació entre pes i volum.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline.</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction.</i>
pH	Variable del pH a la DCU del Biostat MCD.
$pO_2$	Variable del $pO_2$ a la DCU del Biostat MCD, %.
$pO_2$	Concentració de l'oxigen dissolt en la fase líquida, %.
$P_v$	Productivitat volumètrica, $\mu g/(ml \cdot h)$ .
Pyr	Piruvat
Q	Cabal del líquid en el mòdul de microfiltració, ml/min.
$Q_{add,i}$	Valor actual del cabal de la bomba FE-211, ml/min.
$q_p$	Velocitat específica de la producció de producte, $nmol/(10^6 \text{ cel} \cdot h)$ .
$q_{Cp}$	Velocitat específica del consum o la producció del component $C_p$ , $nmol/(10^6 \text{ cel} \cdot h)$ .
$q_{Glc}$	Velocitat específica del consum de glucosa, $nmol/(10^6 \text{ cel} \cdot h)$ .
$q_{O_2}$	Velocitat específica del consum d'oxigen, $nmol/(10^6 \text{ cel} \cdot h)$ .
r	Coefficient de regressió lineal, adimensional.
RNA	Àcid ribonucleic.

RQ	Quocient respiratori.
SAI	Sistema d'alimentació ininterrompuda.
STIRR	Variable de la velocitat d'agitació a la DCU del Biostat MCD, rpm.
SOUR	Velocitat específica del consum d'oxigen, $\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$ .
T	Temperatura, °C.
t	Temps, h.
$t_0$	Temps inicial de registre de l'oxigen dissolt al 50%, h.
TAE	Tampó Tris-Acètic-EDTA.
TCA	Cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de Krebs.
$t_f$	Temps final
$t_i$	Temps actual, h.
$t_{i+1}$	Temps projectat, h.
$t_{i-1}$	Temps anterior, h.
$t_{\text{OUR}_i}$	Temps que triga en confeccionar-se la seqüència d'anàlisi de l'OUR <sub>i</sub> , h.
$t_{\text{pols}}$	Durada del pols d'addició
TOA	Temps d'actuació.
TOF	Temps d'alimentació.
TOH	Temps d'aturada o Temps de recollida.
TOI	Temps d'infecció.
TPI	Temps post infecció.
TRIS	Tris[hidroximetil]- aminometà.
v/v	Relació entre volums.
$V_{\text{add},i}$	Volum de solució d'aliment a addicionar, ml.
$V_{\text{add},i-1}$	Volum de solució addicionada en l'anterior acció de control, ml.
$V_{\text{mostra},i-1}$	Volum de mostra extret per a l'anàlisi fora de línia, ml.
$V_{\text{NaOH},i}$	Volum de solució de NaOH (200 mM) afegida durant un període determinat, ml.
$V_{\text{NaOH}}$	Volum de NaOH afegida, ml.
$V_{r,i}$	Volum del bioreactor en el temps actual, ml.
$V_{r,i-1}$	Volum del bioreactor en el temps anterior, ml.
$V_r$	Volum constant del bioreactor, ml.
V/S	Relació volum-superfície ( $\text{ml}/\text{cm}^2$ )
VP2	<i>Viral Protein 2</i>
X	Concentració de cèl·lules viables, cèl·lules/ml.
$X_0$	Concentració inicial cel·lular a temps igual a zero, cèl·lules/ml.
$X_{\text{max}}$	Valor màxim de la concentració de cèl·lules viables, cèl·lules/ml.
$X_{\text{total}}$	Concentració de cèl·lules totals, cèl·lules/ml.
$X_{\text{viable}}$	Concentració de cèl·lules viables, cèl·lules/ml.
$Y_{X/S}$	Rendiment aparent concentració cel·lular/ glucosa, $\text{mmol}/10^6 \text{ cel}$ .
$Y'_{X/S}$	Rendiment intrínsec concentració cel·lular/ glucosa, $\text{mmol}/10^6 \text{ cel}$ .
$Y_{\text{O}_2/\text{Glc}}$	Rendiment oxigen/glucosa, mmol/mmol.
$Y_{\text{O}_2/X}$	Rendiment oxigen/concentració cel·lular, $\text{mmol}/10^6 \text{ cel}$ .



$\acute{\epsilon}$	Criteri de desviació de la metodologia de detecció del TOI.
$\mu$	Velocitat específica de creixement, $h^{-1}$ .
$\mu_i$	Velocitat específica de creixement pel temps actual, $h^{-1}$ .
$\overline{\mu}_i$	Velocitat específica de creixement mitjana pel temps actual, $h^{-1}$ .
$\mu_{max}$	Velocitat específica de creixement màxima, $h^{-1}$ .
$\mu_{OUR}$	Velocitat específica de creixement estimada a partir de les dades del consum d'oxigen, $h^{-1}$ .
$\mu_{OUR, i}$	Velocitat específica de creixement estimada a partir de les dades del consum d'oxigen pel temps actual, $h^{-1}$ .
$\sigma$	Desviació estàndard.
$\tau$	Valor del temps de residència, $h^{-1}$ .

# ÍNDEX.

1. Resum.....	5
2. Introducció. ....	9
2.1. Els bioprocessos. ....	11
2.1.1. Etapes del disseny d'un bioprocés. ....	13
2.2. El cas d'estudi: la malaltia de Gumboro. ....	20
2.2.1. El virus IBD. ....	23
2.3. Profilaxis contra la malaltia de Gumboro. ....	24
2.3.1. Les vacunes clàssiques. ....	24
2.3.2. Vacunes recombinants. ....	27
2.4. Plantejament del present treball. ....	31
2.5. Bibliografia. ....	33
3. Objectius. ....	35
4. Anàlisi del sistema de referència: obtenció d'una vacuna clàssica basada en l'expansió de virus IBD en Cèl·lules <i>Vero</i> . ....	39
4.1. Introducció. ....	41
4.1.1. Antecedents. ....	41
4.1.2. El sistema IBDV-Cèl·lules <i>Vero</i> . ....	41
4.1.3. Medis de cultiu per cèl·lules animals. ....	42
4.1.4. Sistemes de cultiu. ....	43
4.2. Posada a punt de les tècniques de cultiu i seguiment de la concentració cel·lular en sistemes estàtics. ....	45
4.3. Parametrització de les condicions de cultiu: relació V/S i nivells de CO <sub>2</sub> . ....	47
4.3.1. Estudi de la relació V/S en cultius estàtics. ....	47
4.3.2. Efecte del percentatge de CO <sub>2</sub> en la fase gas dels cultius estàtics en incubador. ....	52
4.3.3. Cultius agitats amb relació V/S=0,12, i un 13% de CO <sub>2</sub> en la fase gas. ....	54
4.4. Cultiu en bioreactor. Sistema indirecte pel manteniment del CO <sub>2</sub> dissolt, basat en la mesura del pH. ....	57
4.5. Cultius en bioreactor de 2 litres. ....	64
4.5.1. Cultiu en bioreactor amb una V/S=0,12. ....	65
4.6. Anàlisi del bioprocés IBDV-Cèl·lules <i>Vero</i> . Possibles alternatives. ....	68
4.7. Bibliografia. ....	72
5. Obtenció de la proteïna recombinant VP2 en el sistema <i>baculovirus-Sf9</i> . ....	75
5.1. Introducció. ....	77
5.1.1. <i>Baculovirus</i> com a vector d'expressió. ....	77

5.1.2.	La cèl·lula receptora, <i>Spodoptera frugiperda</i> 9 (Sf9).....	81
5.2.	Medis de cultiu. ....	83
5.2.1.	Medis de cultiu comercials. ....	83
5.3.	Monitoratge de cultius de <i>Sf9-baculovirus</i> . ....	93
5.3.1.	La mesura en els cultius cel·lulars.....	94
5.4.	Estratègies de cultiu.....	110
5.4.1.	Cultiu en discontinu. ....	112
5.4.2.	Cultiu en discontinu fortificat.....	113
5.4.3.	Cultiu en discontinu alimentat.....	115
5.4.4.	Cultiu en perfusió.....	121
5.5.	Paràmetres claus, temps d'actuació: Definició i detecció en un procés infectiu. ....	123
5.5.1.	Detecció del moment d'infecció o d'alimentació.....	124
5.5.2.	Detecció del moment d'aturada o recollida del cultiu. ....	140
5.5.3.	Proposta d'automatització del bioprocés.....	144
5.6.	Infecció de cultius amb estratègies d'alta densitat cel·lular.....	146
5.7.	Resum dels resultats de producció obtinguts. ....	154
5.8.	Bibliografia. ....	156
6.	Estudi de sistemes d'expressió de VP2 en llevats i bacteris. ....	161
6.1.	Introducció.....	163
6.2.	Sistema d'expressió en llevats: <i>Pichia pastoris</i> .....	164
6.2.1.	Propostes de construcció de diferents soques de <i>Pichia pastoris</i> .....	165
6.3.	Sistema bacterià: <i>Escherichia coli</i> .....	178
6.3.1.	Construcció de les soques d' <i>Escherichia coli</i> .....	179
6.4.	Canvi de proteïna problema: <i>B-galactosidasa</i> . ....	193
6.5.	Bibliografia. ....	194
7.	Desenvolupament del sistema de cultiu basat en <i>Pichia pastoris</i> , i $\beta$ -galactosidasa com a proteïna model. ....	195
7.1.	Introducció.....	197
7.1.1.	Soca de <i>Pichia pastoris</i> seleccionada. ....	198
7.2.	Desenvolupament de la metodologia per al cultiu de <i>Pichia pastoris</i> . ....	198
7.2.1.	Medis de cultiu.....	199
7.3.	Cultius d'alta densitat cel·lular de <i>Pichia pastoris</i> . Cultius discontinus alimentats.....	203
7.4.	Bibliografia. ....	214
8.	Desenvolupament del sistema de cultiu basat en <i>E. coli</i> , i $\beta$ -galactosidasa com a proteïna model. ....	215
8.1.	Introducció.....	217
8.2.	Estudis previs pel desenvolupament d'estratègies de producció en bioreactor.....	218

8.2.1.	Elecció del medi de cultiu.....	218
8.2.2.	Estudi metabòlic i fisiològic de la soca de <i>E.coli</i> M15.....	220
8.3.	Cultius d'alta densitat cel·lular en bioreactors.....	231
8.3.1.	Estratègia per cultius d'alta densitat cel·lular: Cultius discontinus alimentats d' <i>E.coli</i> ....	233
8.3.2.	Adequació i ajust dels paràmetres de control de l'estratègia d'addició dels cultius discontinus alimentats.....	238
8.4.	Bibliografia.....	264
9.	Anàlisi dels bioprocessos i avaluació econòmica.....	267
9.1.	269	
9.2.	Introducció.....	269
9.3.	Definició de les variables de disseny dels bioprocessos.....	270
9.3.1.	Sistema productiu de la vacuna clàssica IBDV-Cèl·lules <i>Vero</i> .....	271
9.3.2.	Sistema d'expressió <i>Baculovirus-Sf9</i> .....	273
9.3.3.	Sistemes d'expressió <i>Escherichia coli</i> i <i>Pichia pastoris</i> .....	274
9.4.	Descripció dels bioprocessos.....	276
9.4.1.	Diagrama de procés basat en el sistema IBDV-Cèl·lules <i>Vero</i> .....	277
9.4.2.	Diagrama de procés basat en el sistema <i>baculovirus-Sf9</i> .....	279
9.4.3.	Diagrama de procés pel sistema basat en la producció de VP2 en <i>E.coli</i> .....	281
9.4.4.	Diagrama de procés pel sistema basat en la producció de VP2 en <i>P.pastoris</i> .....	283
9.5.	Avaluació econòmica.....	285
9.5.1.	Inversió total del projecte.....	285
9.5.2.	Anàlisi de rendibilitat.....	289
9.5.3.	Avaluació econòmica dels bioprocessos.....	291
9.6.	Bibliografia.....	299
10.	Conclusions.....	301
11.	Materials i mètodes.....	309
11.1.	Biocatalitzadors.....	311
11.1.1.	Organismes utilitzats.....	311
11.1.2.	Manteniment de les diferents línies cel·lulars.....	313
11.2.	Medis de cultiu.....	321
11.2.1.	Medis pel cultiu de cèl·lules <i>Vero</i> .....	322
11.2.2.	Medis pel cultiu per a cèl·lules <i>Sf9</i> .....	323
11.2.3.	El sèrum, suplement de medis de cultiu per cèl·lules animals.....	329
11.2.4.	Medis pel cultiu de <i>E.coli</i> .....	330
11.2.5.	Medis pel cultiu de <i>P. pastoris</i> .....	335
11.2.6.	Additius pel cultiu en bioreactor.....	338
11.3.	Tècniques analítiques.....	339

11.3.1.	Tècniques microbiològiques.....	339
11.3.2.	Tècniques de DNA recombinant.....	346
11.4.	Sistemes de cultiu a petita escala.....	360
11.4.1.	Cèl·lules animals.....	360
11.5.	Cultiu en bioreactor.....	361
11.5.1.	Bioreactor Biostat MCD.....	362
11.5.2.	Bioreactor Biostat Bplus.....	365
11.5.3.	Equipaments dels bioreactors.....	367
11.6.	Bibliografia.....	373
12.	Annexes.....	385
12.1.	Informació del gen VP2.....	387
12.1.1.	Seqüència del gen de la VP2.....	387
12.1.2.	Dianes de restricció en el gen VP2.....	388
12.1.3.	Mapa de restricció del gen VP2.....	389
12.2.	Informes de l'avaluació econòmica.....	390
12.2.1.	IBDV-Cèl·lules Vero.....	390
12.2.2.	<i>Baculovirus-Sf9</i> .....	394
12.2.3.	<i>Pichia pastoris</i> .....	398
12.2.4.	<i>Escherichia coli</i> .....	402
12.3.	L'embrió del treball.....	407

**1. RESUM.**



El present treball estudia el desenvolupament d'un procés per a l'obtenció d'una vacuna recombinant per a la protecció de les aus de les explotacions agropecuàries de la malaltia de Gumboro o IBD (Infectal Bursal Disease). El treball planteja estudiar diferents sistemes alternatius, fonamentalment dissenyats al voltant de diferents sistemes biològics, per tal de poder-ne fer, al final del mateix, una comparació en termes de valoració econòmica i en termes de viabilitat tecnològica, donat que aquests dos tipus d'estudis són els elements essencials a l'hora d'establir un bioprocés.

Després de la introducció general del treball, on es recullen els aspectes més importants d'aquesta malaltia, el virus que la provoca, i la rellevància de la seva profilaxis, i de fixar els objectius del treball, s'analitza un primer sistema, en el Capítol 4. Aquest sistema consisteix en l'obtenció del virus IBD a partir de la infecció de cèl·lules *Vero*. Es tracta d'un sistema que es podria anomenar convencional, i que normalment requereix d'una posterior atenuació dels virus obtinguts per tal de preparar les vacunes. Aquesta aproximació està relativament estandarditzada, ja que s'aplica per a la producció de diferents tipus de vacunes, i de cara a aquest treball esdevé el sistema de referència.

En els capítols següents, s'analitzen tres alternatives al procés anterior. Totes tres tenen en comú que l'agent vacunal ja no consisteix en el propi virus que provoca la malaltia inactivat, sinó en una proteïna de l'envolta del mateix virus, VP2, que ha estat identificada com a responsable de provocar una resposta immunològica adequada en els animals, i els hi confereix protecció en front de la malaltia. S'analitza doncs, la possibilitat d'obtenir VP2 recombinant, fet que permetria desenvolupar vacunes més segures tant en la manipulació del procés com del producte en sí, i en la seva aplicació. El Capítol 5 es dedica a l'expressió de VP2 mitjançant un *baculovirus* recombinant, que al seu temps infecta cultius de cèl·lules d'insecte (*Sf9*), utilitzant un sistema d'expressió que ha estat cedit per a realitzar aquest treball.

En el Capítol 6, s'estudia l'expressió de VP2 en cèl·lules bacterianes (*Escherichia coli*) i en llevats (*Pichia pastoris*). És conegut el potencial d'aquests sistemes donat que permeten assolir concentracions cel·lulars i de producte molt elevades, però per altra banda presenten més dificultats i limitacions en l'expressió de molècules complexes. Així doncs, els esforços que s'han dut a terme amb aquests sistemes només han permès expressar VP2 en *E.coli* mitjançant una proteïna de fusió, però sense aconseguir obtenir clons estables, i no ha estat possible aconseguir l'expressió de VP2 en *P.pastoris*. No obstant, es considera que un treball més aprofundit que el que s'ha pogut plantejar en el temps disponible per a realitzar aquest



treball, podria permetre assolir aquesta expressió. Així doncs, per tal de poder valorar el potencial que podria tenir aquesta opció, i fins i tot ajudar a valorar la necessitat de treballar-hi en més profunditat, el treball analitza i desenvolupa el sistema d'expressió basat en *E.coli* i *P.pastoris* emprant una altra proteïna recombinant com a model,  $\beta$ -galactosidasa, de la que es disposa de clons estables en els dos sistemes.

Els sistemes de cultiu per a l'obtenció de  $\beta$ -galactosidasa s'analitzen en els Capítol 7 (*P.pastoris*) i el Capítol 8 (*E.coli*). Encara que no s'hagi pogut expressar la proteïna inicialment desitjada, les dades obtingudes en aquests capítols permeten obtenir informació rellevant sobre aquests tipus de cultius, permetent realitzar l'estudi d'alternatives de bioprocés plantejat com a objectiu principal del treball.

Finalment, el Capítol 9 planteja una síntesi de tot el treball, en la que es comparen les quatre alternatives amb les que s'ha treballat. La comparació és duu a terme mitjançant el plantejament d'un bioprocés a escala industrial complet per cada cas, dimensionant-lo en funció d'un escenari de producció comú i emprant les dades experimentals obtingudes en els respectius capítols pels diferents sistemes, i per acabar, la seva conseqüent valoració en termes econòmics. Malgrat algunes de les aproximacions que s'ha hagut de fer, la vàlua d'aquesta anàlisi és permetre identificar la potencialitat de cadascun dels quatre bioprocessos, aportant elements molt interessants de cara a possibles preses de decisió sobre la seva possibilitat d'implementació.

Cal dir que aquest treball ha comptat amb diverses col·laboracions, entre les que es destaquen la de Laboratorios HIPRA (Amer, Girona) i INGENASA (Madrid), empreses amb les que s'ha desenvolupat una part d'aquest treball, mitjançant projectes conjunts amb el Grup d'Enginyeria Cel·lular i Tissular (GECIT) del Departament d'Enginyeria Química de la UAB. Per aquesta raó, en alguns moments del treball s'han hagut d'ometre detalls específics que, no obstant, no afecten la seva comprensió ni la valoració dels sistemes estudiats.

**2. INTRODUCCIÓ.**



## **2.1. Els bioprocessos.**

Els bioprocessos es centren en l'ús industrial d'organismes vius, part d'ells, o sistemes i molècules d'origen biològic (com per exemple els virus i els enzims) amb la finalitat d'obtenir nous productes o bé degradar residus nocius. Els bioprocessos s'apliquen a diferents tipologies d'indústria, com l'alimentària, indústries químiques, indústries de medi ambient, farmacèutiques, veterinàries i recentment els bioprocessos estan introduint-se directament en el camp de la biomedicina, estudiant-se noves possibles teràpies com la gènica, la cel·lular, la tissular o la viroteràpia.

Encara que es podria dir que l'origen dels bioprocessos es situa en temps molt antics, en processos de biotransformació bàsicament fermentativa de productes d'origen agrícola per a l'obtenció de productes alimentaris (les primeres evidències daten del 4000 a.C. on es descriu el procés d'elaboració de cervesa en l'antiga Mesopotàmia (Duboë-Laurence i Breger 1985), i que el nombre de bioprocessos ha anat augmentant i evolucionant el llarg del segle XX, la revolució biotecnològica va arribar de la mà de la possibilitat i de la capacitat de manipular el DNA. L'inici de l'anomenada Biotecnologia Moderna es sol situar als inicis dels anys setanta, quan es realitzà amb èxit el primer experiment emprant DNA recombinant per Cohen i Boyer (1973). Els posteriors avenços en l'Enginyeria Genètica i Molecular han fet canviar de ple la concepció de la biotecnologia i conseqüentment la de les disciplines que s'hi relacionen directament, principalment en el camp de la medicina, l'agricultura i el medi ambient.

Actualment el camp que genera més expectatives i on es dipositen més esforços per a desenvolupar nous productes i nous bioprocessos que permetin l'aplicació de noves teràpies es situa en l'àmbit de la salut. En el període considerat entre els anys 1996 i 2005, s'ha llençat al mercat una mitjana anual de 6 nous productes biofarmacèutics, aproximadament un 9% del total dels productes farmacèutics (<http://www.pjbpubs.com/pharmaprojects>), i a nivell general en el 2005 hi ha disponibles en el mercat europeu uns 85 productes biofarmacèutics, més del doble respecte les dades de 1996. El mercat mundial de productes biofarmacèutics, considerant el total de vendes realitzades al 2005, fou de 41.175 milions d'euros, amb un increment de gairebé el 20% anual (IMS Health, EuroBio 2006 Press Kit), mostrant-se com un mercat contínuament a l'alça. El cas concret de les vacunes recombinants, tot i assumir un paper cada vegada més important dins del mercat dels biofarmacèutics, avui en dia només representen un 1% del total del mercat global, tot i que en els últims anys ha doblat el seu

valor (Bio4EU synthesis report), i un 46% del total de vacunes disponibles al mercat europeu pertanyen a la categoria de vacunes recombinants. Entre les vacunes recombinants destaquen la vacuna pel tractament de l'Hepatits B, "Cholera toxin B" pel tractament del còlera, rHPV pel càncer de matriu.

A mesura que es van desenvolupant i validant noves teràpies, aquestes necessiten plataformes industrials basades en el bioprocés per a la producció dels elements necessaris (biomolècules, virus, cèl·lules, teixits...) per la seva universalització, de manera que puguin arribar al conjunt de la societat. L'aplicació industrial de la Biotecnologia ha augmentat de forma notable ja entrada la segona meitat del Segle XX. A la Taula 2-1 es mostren a tall d'exemple alguns productes biotecnològics en l'àmbit de la salut.

	Producte	Organisme	Producció mundial anual (Kg/any)
Antibiòtics	Penicil·lina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	$3 \cdot 4 \cdot 10^7$
	Tetraciclins	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	$1 \cdot 10^7$
	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	$2 \cdot 10^6$
Vacunes	Diftèria	<i>Corynebacterium diphtherie</i>	$1 \cdot 10^4$
	Tètanus	<i>Clostridium tetani</i>	
	Tosferina	<i>Bordetella pertussis</i>	
	Poliomielitis	Virus-cèl·lula mamífer	
	Rubèola	Virus-cèl·lula mamífer	
	Hepatitis B	Llevat recombinant	
Proteïnes terapèutiques	Insulina	<i>E. coli</i> recombinant	$1,5 \cdot 10^4$
	Hormona de creixement	<i>E. coli</i> o cèl·lula eucariota	
	Eritropoietina	Cèl·lula mamífer	
	Anticossos monoclonals	Hibridomes, CHO, NSO	

Taula 2-1: Exemple de diversos productes biotecnològics que es produeixen per a cobrir necessitats en el camp de la salut, on es detalla l'organisme que s'emptra en el bioprocés i la quantitat anual produïda.

La complexitat intrínseca dels bioprocessos fa que el seu desenvolupament, disseny, i operació, només es pugui dur a terme de forma eficient des d'una aproximació multidisciplinària, amb la conformació d'equips de treball integrats per biòlegs, químics,

bioquímics, biotecnòlegs, enginyers,... Inclús de forma ja més recent s'han creat nous estudis com els de Biotecnologia i Enginyeria Bioquímica, per a poder formar personal per a treballar en aquest camp.

### 2.1.1. Etapes del disseny d'un bioprocés.

El desenvolupament d'un bioprocés per a assolir la manufacturació i comercialització d'un producte, i en particular quan té aplicacions en el camp de la salut, és llarg i costós, i s'ha de considerar un seguit d'etapes que es descriuen tot seguit. Des de l'inici del desenvolupament s'ha de tenir en compte que les decisions que es prenguin a cada etapa, influiran directament a les característiques i definició d'altres àrees del bioprocés, i per tant resulta important la interrelació entre les diferents disciplines i equips de treball. La interdependència de les diferents disciplines que caracteritza el desenvolupament d'un bioprocés es simbolitza en la Figura 2-1.

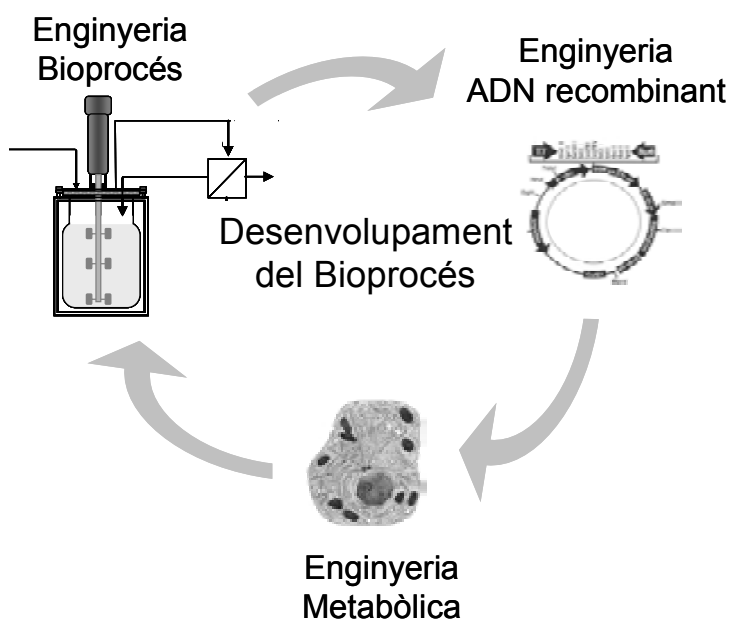


Figura 2-1: El procés global de desenvolupament d'un bioprocés, representa un esforç multidisciplinari per tal de poder donar resposta als diferents aspectes que cal consolidar, des de la construcció del biocatalitzador, la definició dels medis de cultiu i estratègia de cultiu, i el monitoratge i control del bioprocés.

**Definició del producte:** Cal definir en primer lloc quina problemàtica o necessitat es vol resoldre, i quin és per tant el producte que es vol obtenir. És a dir, definir l'aplicació a que es vol destinar el producte, ja sigui un producte nou que cobreixi un forat en el mercat o una nova aplicació d'un producte ja existent. A partir de la seva definició, es poden fixar les possibles alternatives que hi ha. A tall d'exemple, en el cas de la profilaxis per a la prevenció

d'una malaltia, el producte pot ser una vacuna clàssica (un virus atenuat), o bé una vacuna recombinant (una proteïna) a definir entre múltiples candidats. S'ha de definir, no tan sols el tipus de producte, sinó també les característiques que ha de complir, com l'activitat biològica, el risc de manipulació del producte durant la seva producció, l'eficiència, l'estabilitat, etc.. En aquesta etapa s'usen tècniques d'enginyeria de proteïnes i enginyeria molecular, per tal de definir de forma acurada les característiques de la molècula que es vol obtenir.

**Definició i elaboració del Biocatalitzador:** El següent pas consisteix en dissenyar i preparar el sistema biològic en el que s'expressarà el producte desitjat, és a dir el que s'anomena biocatalitzador. En aquest punt és molt importat tenir en compte que el procés de producció i de purificació que s'haurà de definir posteriorment dependrà directament del tipus de biocatalitzador i de la construcció que s'hagi definit, juntament amb les característiques que imposi el producte i la seva qualitat. El fet de no tenir en compte aquesta característica duu sovint a que alguns bioprocessos quedin descartats per manca de viabilitat econòmica, tot i que el producte respongui a les característiques definides. Aquesta etapa es centra bàsicament amb l'ús d'eines de la biologia molecular i la tecnologia del DNA recombinant, que afegeix un ventall d'eines cada vegada més potents, per tal de dissenyar modificacions genètiques sofisticades. En el cas de producció de proteïnes recombinants aquesta tasca es centra en primer lloc en la identificació, l'obtenció i realització de les modificacions necessàries del gen que codifica per la proteïna. En segon lloc en la tria i construcció del vector que posteriorment s'ha d'emprar en la modificació de l'organisme que es vol usar per a la expressió de la proteïna. En aquest procés s'ha de tenir en compte de dotar a l'organisme i al producte de característiques que permetin la seva producció i purificació posterior, com ara la resistència a antibiòtics per a poder realitzar pressió de selecció per a evitar pèrdues d'expressió, així com elements que facilitin la identificació i seguiment del producte com la inserció d'epítops específics identificables per algun anticòs, o també la inserció de proteïnes amb afinitats per altres molècules que facilitin la purificació.

**Avaluació de l'eficiència dels nous candidats a productes:** Una vegada obtinguts els sistemes biològics que expressen els productes candidats, és necessària la producció a petita escala, per avaluar les propietats dels candidats, en comparació amb les dels productes ja existents si és el cas. En l'àmbit de la biotecnologia aplicada a la salut, les proves d'avaluació d'aquestes propietats (per exemple l'eficiència terapèutica) depenen del tipus d'aplicació final (diagnosi, profilaxi, teràpia,...), i del sector (salut humana o salut animal).

En el cas de la profilaxi en animals de granja, que és el tema en que s'emmarca aquest treball, la valoració del possible producte, és a dir del candidat vacunal, ha de superar les

proves dels anomenats assaigs preclínic. Aquests assaigs es centren en realitzar proves *in vitro* (amb cultius cel·lulars) i *in vivo* (amb animals) per a demostrar no tan sols l'eficàcia de la vacuna, sinó els possibles efectes nocius que pugui provocar directament o indirectament, el subministrament de la mateixa. Les proves a que s'han de sotmetre els candidats estan regides a la Comunitat Europea pel CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use).

Els diferents estudis es centren en estudiar els efectes farmacològics incloent-hi la dosi a subministrar, els efectes toxicològics com la mutagènesi (capacitat de provocar mutacions a altres gens per part del fàrmac), la teratogènesi (malformació del fetus i d'òrgans) i la carcinogènesi (la inducció de càncers o carcinomes). Finalment els estudis també es centren en descriure l'absorció, l'administració, així com el metabolisme associat al producte i la seva excreció:

- L'*absorció* inclou les rutes d'administració, dosis, efectes de la ingesta alimentària, eficiència d'absorció i l'efecte del pas pel fetge.
- La *distribució* inclou la distribució en els teixits, l'acumulació en el sèrum, en el líquid cefaloraquídi ( líquid incolor situat en l'espai subaracnoïdal, en els ventricles cerebrals i en l'epèndima), orina i bilis.
- El *metabolisme* fa referència als òrgans i als percentatges de toxicitat i teratogenecitat dels metabòlits. Aquests efectes sobre la malformació dels òrgans s'han devaluar no tan sols pel producte d'estudi, sinó també pels metabòlits que se'n puguin derivar.
- L' *excreció* fa referència a les quantitats i les rutes que desenvolupa l'individu per a excretar la substància que se li ha administrat, així com la permanència d'aquesta en el cos i aparells vitals de l'individu.

Durant aquesta etapa de desenvolupament i amb els resultats que s'obtenen els investigadors ja són capaços de descartar alguns del candidats que inicialment havien estat seleccionats, reduint-ne així el nombre de candidats. Les tasques que es desenvolupen es centren en el camp de la salut, ja sigui veterinària o mèdica.

**Parametrització i caracterització del biocatalitzador: Primers cultius.** Amb el nombre ja reduït de productes candidats, en aquesta fase s'analitzen les característiques cinètiques del biocatalitzador, i la seva capacitat de producció en cultiu. La caracterització de



les cinètiques ha de descriure el creixement i divisió del propi biocatalitzador, l'expressió de la proteïna o del producte en general, el consum de substrats, etc., així com dades de rendiments entre diferents paràmetres com biomassa-substrat, producte-substrat, producte-biomassa, etc.. Aquests paràmetres estan directament relacionats amb el medi de cultiu. L'estudi metabòlic i fisiològic ha de permetre ajustar el medi escollit anteriorment i descriure les problemàtiques o característiques del biocatalitzador, per a poder dissenyar l'estratègia de producció més adequada i rendible.

En els processos industrials productius, la quantitat de producte que s'assoleix per procés depèn de la capacitat i eficiència intrínseca del biocatalitzador que s'utilitzi, és a dir, de la productivitat específica, com de la quantitat de biocatalitzador actiu disponible per a la producció. És per aquest motiu que hi ha un interès en desenvolupar processos productius d'alta densitat, però tenint en compte que el destí final és la comercialització d'un producte, aquests estudis s'han de realitzar en condicions acceptables per les empreses productores, tant a nivell econòmic com de simplicitat i robustesa del procés. La Figura 2-2 mostra un esquema dels passos per a definir un bioprocés, des de l'inici amb la definició del producte, fins a la proposta del bioprocés complet.

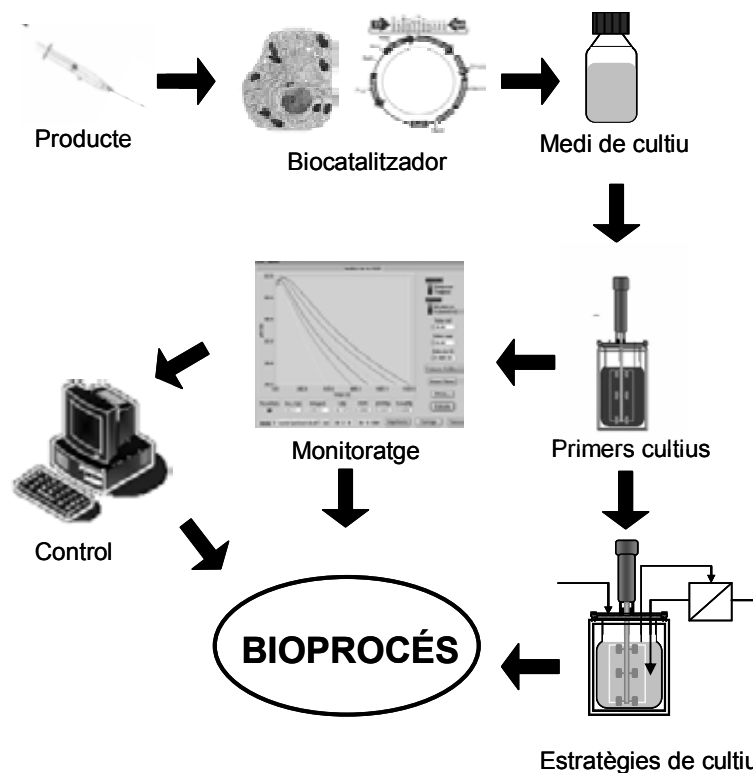


Figura 2-2: Esquema dels passos a seguir per a desenvolupar un bioprocés, des de la definició del producte fins a la proposta d'automatització del bioprocés.

Aquests experiments es realitzen a escala de laboratori, i han d'analitzar les diferents possibilitats o tipus d'estratègia d'operació per a cadascun (discontinu, discontinu alimentat, semicontinu en perfusió, sistemes de dues etapes...), obtenint així diferents opcions productives per a cadascun dels candidats triats. Tot i que en aquest estadi encara no s'està dissenyant la planta de producció, sí cal tenir en compte que algunes de les definicions que es realitzin a aquest nivell, hi estan fortament relacionades. Finalment s'ha de dissenyar els mecanismes de monitoratge i control del procés que siguin necessàries, definint com s'ha de dur a terme el bioprocés, i com pot ser automatitzat basant-se amb les dades obtingudes en el monitoratge.

**Definició del bioprocés productiu i de purificació: Anàlisi del procés.** El següent pas a efectuar pels candidats no descartats i els seus corresponents biocatalitzadors és la definició a grans trets de les diferents etapes de producció i de purificació del bioprocés per a arribar a l'obtenció del producte. Tota la informació generada fins aquest moment en les etapes anteriors ha de permetre caracteritzar un bioprocés, i la definició de les diferents etapes que el conformen estan directament relacionades amb les decisions que s'hagin pres anteriorment.

Per a poder realitzar l'anàlisi del procés s'ha de començar per fixar la producció anual estimada. Per tal de poder quantificar la producció és necessari un estudi de mercat en el que es defineixi la potencial demanda del producte, tenint en compte l'àmbit d'influència que pot aconseguir l'empresa i la quota de mercat assolible en funció de la resta de productes ja existents pel mateix ús i el nombre d'empreses que els produeixen. L'anàlisi del mercat és una tasca delicada en la que s'ha de tenir en compte les característiques dels diferents productes de la mateixa família, avaluant els avantatges i desavantatges de cadascun dels productes, i estudiant també l'evolució d'altres productes similars en el passat i la seva implementació comercial.

En el cas de la profilaxis, aquest estudi es realitza a partir del coneixement del nombre d'individus que s'han de vacunar per any en una regió concreta definida, i partir de la definició de la quantitat d'antigen que s'ha de subministrar per individu. Aquest segon aspecte suposa disposar d'una informació que implica un treball de desenvolupament previ de la vacuna en sí, i de les proves immunològiques del nou candidat vacunal. Un estudi de l'evolució des dels darrers anys i la conseqüent projecció esperada en un futur proper de la població sensible de ser vacunada, juntament amb un coneixement de la legislació (obligatorietat de vacunació o no), permet fer una predicció més ajustada de la quantitat de producte a subministrar.

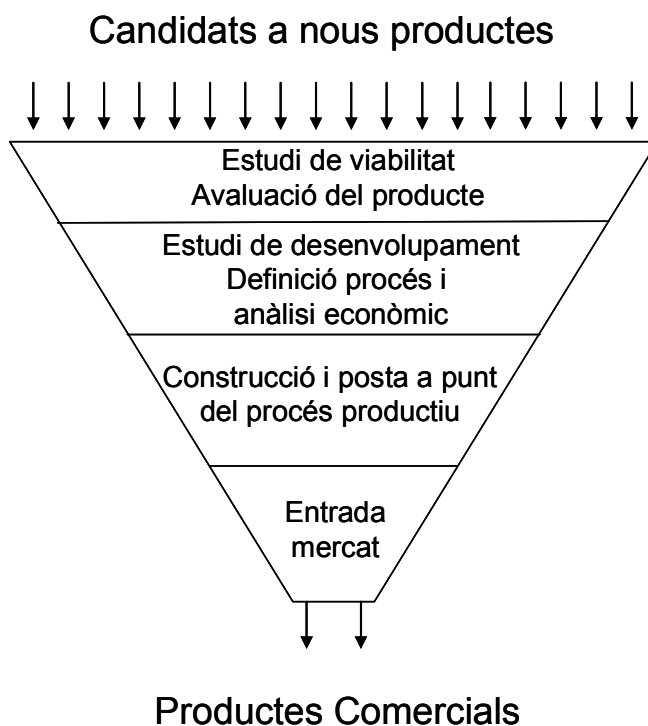
Una vegada quantificada la producció anual, s'ha de definir les principals etapes que han de compondre tot el procés de producció i de purificació del producte, on s'ha de quantificar amb una certa precisió els rendiments (referits a la quantitat de producte restant, respecte a la quantitat inicial) que hi ha en cadascuna de les principals etapes (sobretot pel que respecta a la purificació), i els costos associats a aquestes etapes. La quantificació del procés, és a dir, l'anàlisi macroscòpic del balanç de matèria per al producte es fixa a partir de les condicions de sortida de la planta (balanç de flux invers), tenint com a objectiu la quantificació del producte brut a generar en el bioreactor. A partir d'aquesta dada es poden avaluar les principals necessitats de medis de cultiu i reactius.

Així doncs, tenint en compte les dades sobre les característiques del biocatalitzador que s'han obtingut en etapes anteriors, les etapes definides de reacció i de purificació, i les necessitats de producció, es poden comparar les diferents alternatives, tant a nivell de bioprocés com també a nivell econòmic. És finalment el criteri de viabilitat econòmica el que acaba marcant, en gran part, la prioritat en els criteris de selecció del candidat que serà escollit finalment.

**Síntesi del procés:** Amb el candidat seleccionat, la següent fase (la síntesi), consisteix en definir i seleccionar el conjunt d'operacions unitàries que cal desenvolupar en el procés global d'obtenció del producte (producció, purificació, empaquetament,...) seguint els requeriments de qualitat i seguretat del procés i del producte amb un grau de detall superior al que s'ha tingut en les etapes preliminars de selecció, prèviament descrites. En aquest disseny s'ha de tenir en compte la identificació de quins són els colls d'ampolla del procés, avaluar-los i oferir alternatives per a resoldre'ls. A part del disseny de les operacions unitàries, també s'han de considerar els serveis necessaris, els equips auxiliars del procés, així com el tractament dels residus que es formaran a la planta. És una etapa on el nivell de detall augmenta, així com la precisió en els càlculs i les estimacions. Al final d'aquesta etapa han de quedar confeccionats els plànols del disseny d'enginyeria preliminar, basats en el màxim nombre de dades i en coneixements i estudis de canvi d'escala del procés.

**Disseny d'Enginyeria:** Completada l'etapa de síntesi del procés, el darrer pas, consisteix en confeccionar els plànols d'enginyeria complets, on es recullin en el màxim detall totes les especificacions necessàries i ubicació en la planta (plànol d'implementació) per a la seva futura construcció. Aquestes tasques de disseny acostumen a ser dutes a terme per empreses especialitzades.

Durant aquest procés, on es van succeint les diferents etapes, s'observa una disminució molt important del nombre de candidats a nous productes a mesura que avança l'estadi de desenvolupament i de coneixement del bioprocés, i es descarten candidats per manca de viabilitat. Les opcions d'un producte que es troba en fase de recerca i desenvolupament d'arribar a la comercialització es situen entre un 1 i un 3 % d'èxit, i en el cas de biofàrmacs, la relació disminueix fins a un 0,1% d'èxit per als nous candidats (Bergeron i Chan·2004). Només en els primers estadis on s'estudia i avalua el procés a escala laboratori o pilot, es descarten aproximadament un 50% dels candidats (Harrison *i col.*·2003). A la Figura 2-3 es descriu aquest procés, en el que es produeix una dràstica reducció de productes candidats a mesura que es van succeint les diferents etapes de desenvolupament, fins arribar al producte que finalment es produirà i es comercialitzarà.



---

Figura 2-3: Figura on s'esquematitza com a mesura que s'avança en les etapes de desenvolupament d'un bioprocés, van reduint-se el nombre de candidats a nous productes, de forma que només un reduït percentatge arriben a comercialitzar-se.

---

Pel que fa als productes amb aplicacions al camp de la salut, els recursos necessaris per a poder realitzar un programa sencer de desenvolupament d'un nou producte, estan a l'abast d'un nombre reduït d'empreses, degut a l'alt cost que representa. A més, en aquest camp, el procés de validació dels requeriments que ha de tenir el producte i el seu procés d'obtenció es sotmeten a un estricte control que és llarg i costós. Per tal de poder arribar a l'explotació comercial, tant els processos com els productes han de ser aprovats per agències d'avaluació com l'AVMA (American Veterinary Medical Association), i l'EMEA (European

Medicines Agency) sota l'assessorament del CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use) (veure <http://www.emea.europa.eu>).

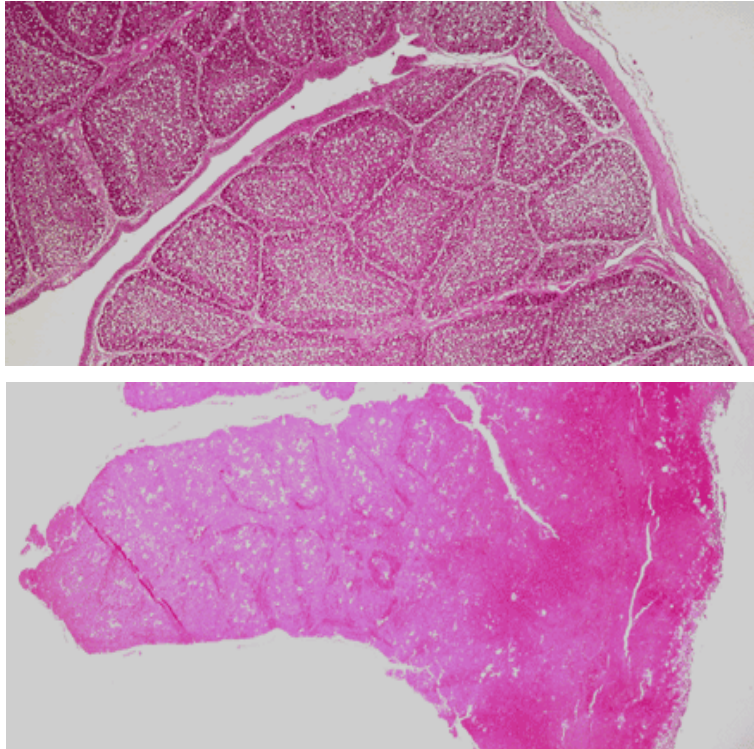
En aquest treball es pretén explorar diferents sistemes productius i analitzar els corresponents bioprocessos per a l'obtenció de material biològic que conformi una vacuna per a la profilaxis d'aus de granja aplicada a la malaltia de Gumboro.

## **2.2. El cas d'estudi: la malaltia de Gumboro.**

La malaltia de Gumboro, és una malaltia vírica que afecta principalment als pollastres d'engreixament industrial i a les gallines de reposició. Aquesta malaltia va ser reconeguda per primera vegada com a entitat patològica específica el 1962 a Gumboro (E.U.A.) (Cosgrove·1962). En estudis posteriors, al principi de la dècada dels setanta, va ser batejada amb el nom de Malaltia Infecciosa de la Bossa de Fabrici (Infectious Bursal Disease, IBD) (Hitchner·1970). Posteriorment, a finals dels anys 80, es van començar a detectar a Europa casos d'IBD causada per soques de virus molt virulents. Aquests brots presentaven quadres clínics aguts i afectaven inclús a pollastres al final de la seva etapa d'engreix, causant una alta mortalitat. La malaltia es va estendre per Àsia, Àfrica, Oceania, Centre i Sud Amèrica. Actualment, aquesta malaltia està estesa pràcticament arreu del món, i és detectada especialment en àrees de gran explotació de granges d'aviram. En aquest moment la vacunació contra el virus d'IBD és universal.

Aquesta malaltia és causada pel virus IBD, que afecta de manera molt acusada les cèl·lules limfoides localitzades a la Bossa de Fabrici, el que comporta l'eliminació selectiva de precursors de limfòcits B i conseqüentment, desenvolupa en els animals un estat general d'immunosupressió.

L'anàlisi histològica d'un tall de la bossa de Fabrici permet estimar la tipologia del virus, la seva virulència, i la seva capacitat de supressió del sistema limfocitari. A la Figura 2-4 es mostra l'anàlisi histològica realitzada en dues bosses provinents d'una au no infectada, i d'una infectada amb IBDV, on es pot observar el nivell d'afectació de la infecció per la pèrdua de l'estructura fol·licular de la bossa.

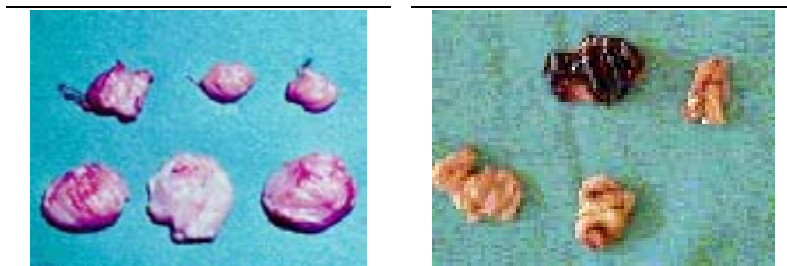


---

Figura 2-4: Imatges comparatives de l'anàlisi histològica d'una bossa de Fabrici d'una au sana (part superior) i d'una au infectada per IBDV, on s'observa la pèrdua de l'estructura fol·licular.

---

Altres lesions que presenten les aus infectades pel virus IBD són la inflamació de les bosses de Fabrici amb edemes amb contingut gelatinós, inclús poden esdevenir hemorràgiques, i amb el pas del temps resulten atròfiques i poden aparèixer també hemorràgies intramusculars. Aquests tipus de lesions s'il·lustren a la Figura 2-5, on es poden comparar bosses de Fabrici sanes i bosses de Fabrici inflamades i atròfiques, i en algun cas, fins i tot hemorràgiques, mostrant-se la severitat dels efectes patològics d'aquesta malaltia. La identificació en les explotacions aviars es basa en un quadre clínic en que les aus pateixen diarrees, eriçament del plomatge, depressió, apatia i pal·lidesa de les crestes, entre d'altres símptomes.



---

Figura 2-5: Comparació de bosses de Fabrici sanes, en front de les bosses inflamades per l'efecte del IBDV (imatge dreta). A la part esquerra, imatge de bosses de Fabrici atròfiques i hemorràgiques que s'observen en estadis avançats de la malaltia.

---

L'estat d'immunosupressió causa un augment del risc a contreure infeccions oportunistes en els animals que han sobreviscut, afectant el creixement de les aus i augmentant la taxa de mortaldat derivada de la mateixa malaltia. A més, aquest estat també fa disminuir la resposta dels animals a vacunes contra altres patògens de l'aviram (Becht i Muller-1991). Algunes soques molt *virulentes* de IBDV poden produir un índex de mortaldat des d'un 30, fins a un 60% en pollastres de 3 setmanes d'edat, i els animals que sobreviuen presenten llargs períodes d'immunosupressió. Les seqüeles que comporta aquest estat són: dermatitis gangrenosa, síndrome d'anèmia-hepatitis amb cossos d'inclusió, infeccions per *E. coli*, i la ja esmentada baixada d'eficàcia d'altres vacunes.

La via de transmissió pot ser directe o indirecte, ja sigui a través dels excrements d'aus malaltes (directe), o bé a través del personal de l'explotació o d'insectes com l'*Alphitobius diaperinus* (indirecte).

Fins al moment, no s'ha descrit cap tractament eficaç per a combatre la malaltia, i només s'aplica un seguiment de les aus malaltes per a controlar les infeccions oportunistes i l'estat d'immunosupressió. L'èxit del control de la malaltia recau en la vacunació preventiva de les aus reproductores. La immunització de les aus reproductores és d'especial importància per a la transmissió d'immunitat passiva a la progènie. La presència de dita immunitat passiva pot interferir en l'eficàcia de la vacunació de la progènie, en funció de l'edat en què les aus joves són vacunades, i de la virulència de la soca vacunal utilitzada. S'ha demostrat que els anticossos maternals són incapaços de protegir als pollastres d'engreixament davant les infeccions per soques de IBDV virulentes, degut a que aquestes soques presenten petites variacions en la configuració genòmica que els dóna capacitat per a evitar ser bloquejades pels anticossos neutralitzants. Així doncs, els pollets hauran de ser vacunats novament quan el nivell d'immunitat maternal sigui l'adequat per tal que la vacuna no es neutralitzi. per a combatre la malaltia, cal combinar la vacunació de les aus amb una estricta aplicació de programes de desinfecció i higiene de les instal·lacions.

La necessitat de vacunació arreu del món indica la importància econòmica d'aquest producte. Només a Europa hi ha 4.000 milions de pollastres d'engreixament, 270 milions de gallines ponedores i 35 milions de gallines reproductores, i s'administren 5000 milions de dosis per tal de combatre aquesta malaltia. Malgrat tot, s'estima que un 30% de les aus encara queden afectades pel virus d'IBD, i les pèrdues anuals a nivell europeu provocades per aquesta malaltia a les explotacions s'aproximen a 900 milions d' Euros, mentre que a nivell mundial s'estimen en 3.600 milions d' Euros (<http://www.hipra.com/>).

## 2.2.1. El virus IBD.

L'IBDV es el prototipus del gènere *Avibirnavirus* de la família *Birnaviridae* (Dobos *i col.*·1995). Els virions d'IBDV tenen una grandària de 60-65 nm, les càpsides víriques presenten una geometria icosaèdrica, constituïda per una combinació de pentàgons i hexàgons formats per les proteïnes VP2 i VP3. Les estructures de la càpsida que formen aquestes proteïnes es mostren en la Figura 2-6. Aquestes càpsides permeten al genoma viral estar protegit de la degradació que patiria front les condicions ambientals.

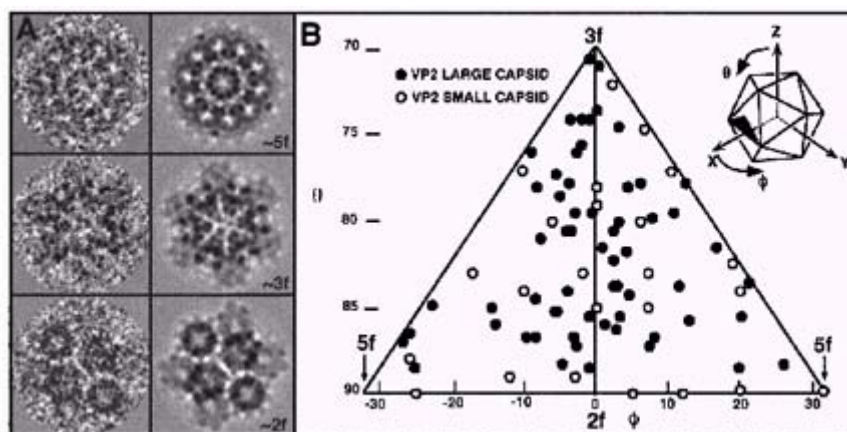


Figura 2-6: Representació de la simetria icosaèdrica de càpsides amb VP2, i esquema de l'orientació de les molècules de VP2, en càpsides de gran i petita grandària. A l'esquerra (A) es poden observar imatges de càpsides obtingudes directament amb microscòpia electrònica. A la dreta (B) s'observa la projecció i els esquemes en tres dimensions reconstruïts segons la corresponent orientació de les molècules de VP2.

El genoma del virus està constituït per dos segments de RNA de doble cadena de 3129 pb (A) i 2759 pb (B) respectivament. El segment A conté dues fases de lectura oberta (ORF), anomenades A1 i A2. La ORF A1 codifica per una poliproteïna de 106 kDa amb capacitat autoproteolítica. Amb el processament de la proteïna s'obtenen tres productes proteics madurs: VP2, VP3 i VP4. Les dues primeres proteïnes formen part de la càpsida vírica, i la VP4 és una proteïna no estructural amb activitat proteolítica (Azad *i col.*·1985; Jagadish *i col.*·1988). Aquest segment, i bàsicament la VP2, és el responsable de la antigenicitat, ja que forma part de la càpsida externa del virus, mentre que la VP3 forma part de la càpsida interna. Com s'indica a la Figura 2-7, la proteïna VP2 posseeix una regió hipervariable (vVP2), que ha suposat fins al moment una gran dificultat per a desenvolupar una vacuna que sigui realment efectiva.



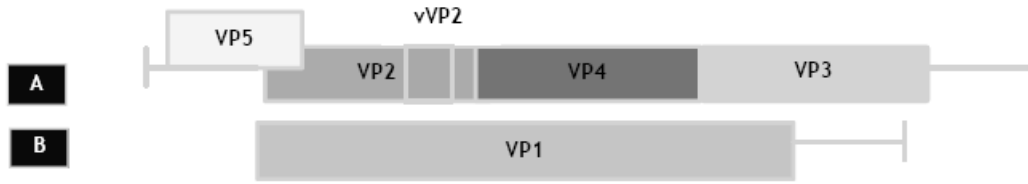


Figura 2-7: Representació simplificada de l'estructura molecular del genoma del virus de IBDV format pels dos segments de RNA. El segment A conté la regió que codifica per les proteïnes que conformen la càpsida externa (VP2) amb la seva regió hipervariable (vVP2), per la càpsida interna (VP3), per la proteasa (VP4) i el gen VP5 del que no s'ha identificat la seva funcionalitat. El segment B conté el gen VP1 que expressa la RNA polimerasa.

La ORF A2 codifica per una proteïna no estructural de 16.5 kDa (VP5), l'activitat de la qual es desconeix (Mundt *i col.* 1995).

Per altra banda, el segment B conté el gen que codifica per a l'expressió de la RNA polimerasa viral, necessària per a la síntesi del RNA que intervé en la replicació vírica.

## **2.3. Profilaxis contra la malaltia de Gumboro.**

### **2.3.1. Les vacunes clàssiques.**

L'origen de les vacunes es situa en l'experiment que va realitzar Edward Jenner, l'any 1796, en el qual va utilitzar la vacunació com a mesura preventiva contra la verola, malaltia mortal en aquella època. La vacunació consistí en l'administració, a un infant, de material provinent de pústules d'una vaca causades per la infecció d'una variant del mateix virus infectiu per aquests animals, que li va oferir resistència al ser posteriorment exposat al virus que afectava als humans. El mot anglès *Vaccination* (vacunació) prové del mot llatí *vacca* (vaca). Des d'aleshores s'han estat utilitzant les vacunes com a mesura profilàctica per a prevenir una gran quantitat de malalties, tant en homes com en animals.

Les vacunacions convencionals consisteixen en la introducció del propi agent infeccios que produeix la malaltia, o part d'ell, ja mort o modificat (*atenuat*), de tal manera que no es pot desenvolupar la malaltia un cop introduït en el cos del pacient. Una vegada la vacuna ha estat administrada, els neutròfils del cos són els encarregats de transmetre la informació necessària a les cèl·lules immunitàries, que passen a produir els anticossos específics

capaços de reconèixer l'agent infecció. Aquest, al ser reconegut per l'anticòs, pot ser eliminat per altres cèl·lules immunitàries, mecanisme que protegeix l'individu de la malaltia. Si posteriorment el cos reconeix altra vegada aquest agent infecció, encara que sigui en forma salvatge, els anticossos i limfòcits el detecten, i el destrueixen. Per tant, l'eficàcia de les vacunes dependrà de la forma de preparació, formulació, administració i de la dosi administrada, que generin els efectes protectors buscats, i al mateix temps, eviti efectes secundaris no desitjats.

El problema principal que es desprèn d'aquesta pràctica es basa en el fet d'administrar a l'individu productes patògens procedents del virus, ja sigui mort o inactivat, o les seves secrecions. L'administració d'aquests productes pot desencadenar efectes secundaris, sobretot en animals de poc pes (Glazer i Nikaido·1994), podent provocar un afebliment, pèrdua de pes, o fins i tot, l'animal pot arribar a emmalaltir. Un altre risc de treballar amb l'agent infecció consisteix en administrar per error una dosi vacunal mal atenuada a algun animal, fet que comportaria conseqüències contràries a les esperades. En aquest cas, s'estaria propagant el focus de la malaltia, amb conseqüències fatals. És per aquest motiu que, el procediment d'atenuació del virus ha d'estar molt ben controlat.

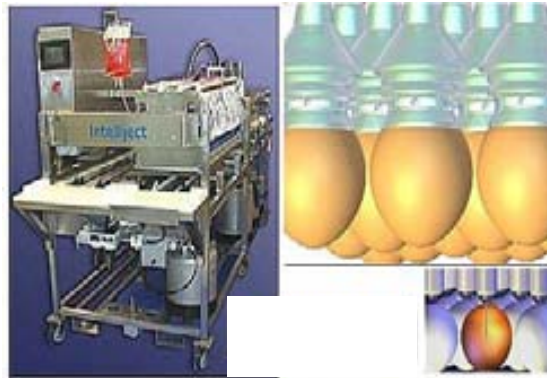
Des del punt de vista de la producció, el fet que s'hagi de produir un agent infecció en grans quantitats implica importants exigències en termes de bioseguretat, tant en el procés productiu, com en el procés de purificació, i en tota la conseqüent manipulació de l'agent infecció. Aquests processos han de garantir tant la protecció dels treballadors (evitant que resultin infectats), com la puresa i adequació del producte. Tots aquestes aspectes acaben tenint una repercussió directe en la construcció i l'operació de la planta productiva, que esdevé molt més complexa i costosa, per tal d'incorporar totes aquestes mesures de bioseguretat, que al seu temps, són exigides per les agències de validació.

Històricament, les primeres vacunes orientades a prevenir les epidèmies causades pel virus IBD es basaven en un preparat d'homogeneïtzats de bosses de Fabrici provinents d'aus que havien desenvolupat la malaltia, amb la intenció de produir lleus infeccions controlades que permetessin desenvolupar el sistema immunològic en les aus. Aquests preparats s'administraven per via oral, i oferien a les aus una certa protecció, de manera que posteriorment, al ser exposats a virus de camp, la simptomatologia que desenvolupaven les aus que havien estat vacunades era menor i més moderada respecte les no vacunades.

## **Producció vacuna clàssica *in ovo*.**

El sistema clàssic que tradicionalment s'ha emprat per a la producció de la vacuna pel tractament de la malaltia de Gumboro, consisteix en realitzar una producció *in ovo*, que es basa en la utilització d'embrions de gallina com a substrat, als que se'ls administra a través d'una injecció el virus nadiu a l'interior dels ous (Figura 2-8). Amb aquest procediment s'aconsegueix, mitjançant la maquinària natural del virus, que aquest es reproduïxi i es multipliqui a l'interior dels ous que han estat infectats. Un cop s'ha completat el cicle d'infecció dels ous, es procedeix a l'extracció de la colònia de virus, i a la seva posterior purificació i inactivació, per a ser utilitzats després com a vacuna.

Com s'ha explicat en l'apartat anterior, aquests virus han de ser atenuats abans de poder ser administrats com a vacuna, de manera que, un cop injectats no puguin desenvolupar la malaltia, al no tenir la capacitat ni d'infectar ni de reproduir-se.



---

Figura 2-8: Imatge de la administració del virus via *in ovo* per a la producció dels agents vírics que conformaran posteriorment la vacuna clàssica atenuada.

---

Aquesta tipologia de vacunes resulten útils per a combatre la fase clínica de la malaltia, però, es va descobrir la capacitat del virus de produir supressió de la bossa de Fabrici, desenvolupant-se una fase subclínica de la malaltia per causa de l'estat d'immunosupressió que afectava a les aus. Per altra banda, la profilaxis amb aquest tipus de vacunes en aus reproductores, ha mostrat uns resultats efectius pel que fa a la transmissió de protecció en front del virus a la descendència durant les dues o tres primeres setmanes de vida, gràcies a la immunitat maternal transferida per mitjà del rovell (Pagès-Manté *i col.* 1991).

Actualment, la combinació de la manca de protecció en termes absoluts, les elevades necessitats de producció, la gran intensitat de mà d'obra associada a la vacuna produïda "*in*

ovo” i les habituals problemàtiques associades a les vacunes convencionals, han fet créixer l’interès en la producció de vacunes alternatives, per exemple mitjançant tecnologia recombinant.

### 2.3.2. Vacunes recombinants.

Les vacunes recombinants, al contrari de les vacunes convencionals, no estan formades per organismes ni components patògens. Una vacuna recombinant té la característica d'utilitzar una subunitat molecular immunodominant del patogen causant de la malaltia, i acostumen a ser subunitats o pèptids de la càpsida externa de l'entitat patògena.

El procés d'obtenció de les vacunes recombinants, s'esquematitza a la Figura 2-9. S'inicia amb la identificació dels diferents candidats, és a dir, subunitats (proteïnes) que normalment formen part de la coberta o càpsida de l'agent infeccios. Un cop identificats els diferents candidats, s'ha d'aïllar el material genètic que codifica per a cadascuna de les proteïnes escollides, i per mitjà de la tecnologia del DNA recombinant obtenir constructes que permetin, un cop introduïts en l'organisme escollit, l'expressió dels candidats vacunals per a poder realitzar les proves immunològiques per a la tria i la verificació de la capacitat de protecció immunològica dels candidats.

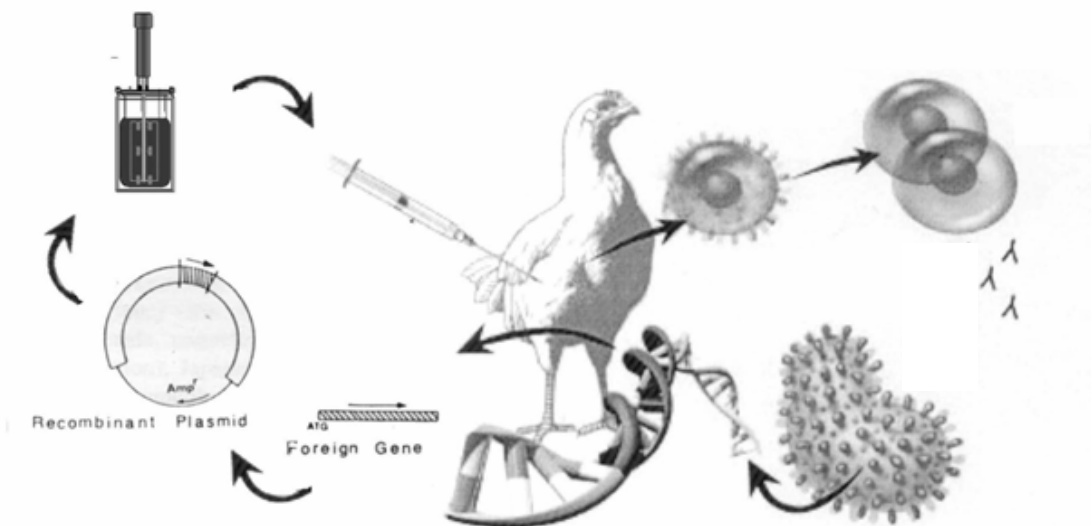


Figura 2-9: La preparació de les vacunes recombinants parteixen de la identificació de subunitats de la càpsida de l'agent infeccios. Un cop definit el candidat vacunal s'aïlla el gen procedent del DNA de l'agent infeccios i es clona en un sistema d'expressió biològic. Posteriorment s'ha de produir el candidat vacunal en un bioreactor, i un cop ha estat purificat es pot administrar a l'animal, el qual desenvolupa el sistema de defensa immunitària, produint els anticossos neutralitzants específics que reconeixen l'agent infeccios.

La primera vacuna recombinant que es va comercialitzar en el mercat mundial, va ser la vacuna contra l'hepatitis B, que es va obtenir gràcies a la introducció d'un gen de la càpsida del virus en llevats (*Saccharomyces cerevisiae*), que expressava una subunitat vírica (partícules virals buides) capaces d'estimular el sistema immune. Actualment, el nombre de vacunes recombinants per a ús humà ha augmentat, i se'n produeixen per a la vacunació contra l'Hepatitis A, la malaltia de Lyme, la meningitis produïda per *Haemophilus influenzae* tipus B, o el còlera, emprant totes elles organismes modificats genèticament (Casal i col. 2000).

El sistema de defensa que s'activa en el cos de l'individu vacunat, és semblant al de la vacuna convencional. A més, les vacunes recombinants afegeixen avantatges pel fet d'administrar tan sols una proteïna en lloc d'un agent infecciós, que són:

- En el nou sistema ja no es treballa amb el virus nadiu. Per tant s'elimina la possibilitat de que per error es provoqui un brot de la malaltia en les granges. De la mateixa manera, ja no seran necessàries totes les mesures de seguretat associades al treball amb virus nadius.
- Poden ser produïdes amb més facilitat i seguretat, amb una reproductibilitat elevada.
- Si el sistema està ben desenvolupat, pot resultar més econòmic.
- Disminueix la possibilitat d'aparició d'efectes secundaris en l'animal vacunat, ja que, com s'ha explicat anteriorment, no es treballa amb organismes patògens ni derivats seus.
- Un cop definit el procés de producció, aquest podrà ser reproduïble amb idèntiques condicions, obtenint-se així el mateix producte en tots els processos de fabricació, assegurant una estandardització òptima.

### **Antecedents: identificació d'un candidat vacunal per a la constitució d'una vacuna recombinant contra la Malaltia de Gumboro.**

El segment A del RNA del virus IBD codifica per una poliproteïna precursora en l'ordre 5'-VPX-VP4-VP3-3' tal i com s'ha mostrat en la Figura 2-7. La poliproteïna precursora es

processa mitjançant diferents passos proteolítics per a produir les proteïnes víriques madures finals, VP2 i VP3, i la proteasa vírica VP4. Les proteïnes VP2 i VP3 són les components majoritàries de l'estructura de la càpsida del virió d' IBDV. La VP2 conforma la part més externa de la càpsida i conté les regions antigèniques responsables per a la inducció d'anticossos neutralitzants (Azad *i col.*·1987). La VP3 es considera l'antigen grup-específic (Fahey *i col.*·1985a). La VP4 ha estat definida com la proteasa vírica responsable del processament de la poliproteïna percussora (Jagadish *i col.*·1988). Es coneix que, la proteïna VP2 es forma a partir del processament proteolític de la VPX, però es desconeixen els punts exactes de tall, i quines proteïnes estan implicades en aquest procés. Aquest processament és fonamental en el procés de conformació de la càpsida vírica. El processament de la poliproteïna es produeix en dues fases independents. La primera, contraduccional, dóna lloc a l'acumulació de tres polipèptids: NH<sub>2</sub>-VPX-VP4-VP3-COOH. La segona fase del processament dóna lloc a la formació de la proteïna madura VP2 a partir del precursor VPX.

La resposta serològica contra el virus es dirigeix fonamentalment a les proteïnes de la càpsida VP2 i VP3. La proteïna VP2 és immunodominant, i és reconeguda de forma invariable per sèrums, tant de pollastres convalescents com d'animals hiperimmunes (Fahey *i col.*·1985b). Nogensmenys, la major part dels anticossos monoclonals capaços de neutralitzar el virus, reconeixen epítops conformacionals de la proteïna VP2 (Fahey *i col.*·1989).

Un cop obtinguda suficient quantitat de cadascun dels possibles candidats vacunals, es proven en animals vius per tal de seleccionar el més efectiu. En el present treball, cal mencionar que aquesta tasca es duu a terme mitjançant un projecte desenvolupat de forma conjunta amb les empreses LABORATORIS HIPRA (Amer, Girona), i INGENASA (Madrid). INGENASA ha desenvolupat el baculovirus recombinants que expressen els candidats vacunals, i LABORATORIS HIPRA ha efectuat la sèrie d'experiments amb pollastres per a comprovar l'eficàcia dels candidats vacunals.

En el cas de la malaltia de Gumboro s'estudien diversos candidats per a la generació de la vacuna recombinant. A continuació s'enumeren els candidats estudiats i els controls que han estat utilitzats en les proves experimentals.

**VP2:** és una proteïna que ha estat descrita com a altament immunològica, i s'obté en forma recombinant a partir de la seqüència del gen aïllat del IBDV.

**VPX:** proteïna abans de ser sotmesa al processament proteolític, posterior a la seva síntesi i anterior al assemblatge de la proteïna VP2 madura en el virus.

**Poliproteïna:** Mescla de VPX (precursora de la VP2), VP3, VP4 i petites quantitats de VP2. Aquesta mescla s'obté al expressar en baculovirus el ORF 1A del genoma IBDV.

**BPL-2:** (control positiu). Vacuna convencional.

Com a **control negatiu** s'hi introdueix PBS en lloc de l'antigen.

De les proves realitzades, la més representativa que mostra l'eficàcia del candidat vacunal per a produir una resposta de protecció immunitària és l'assaig de sueroneutralització, els resultats del qual es mostren a la Taula 2-2. Aquest assaig consisteix en vacunar animals amb els diferents candidats vacunals (una dosi per cadascun dels candidats de 25 µg de proteïna), i passat el temps de resposta del sistema immunitari (28 dies), s'extreu el sèrum de l'animal per a avaluar la concentració d'anticossos neutralitzants que l'animal ha produït. La quantificació es realitza infectant cultius en monocapa als que se'ls afegeix una alíquota de la dilució seriada del virus IBD, i una alíquota de sèrum de l'animal vacunat (que s'inactiva prèviament per a evitar que afecti al desenvolupament del cultiu cel·lular). Posteriorment, s'observa al microscopi quina és la dilució vírica que el sèrum ha estat capaç de neutralitzar, que correspon a aquella amb la que s'ha infectat el cultiu que no presenti efectes citopàtics.

Candidat vacunal	Títol de SN (Unitats Farmacopea Europea)
VP2	200.000
VPX	25.000
Poliproteïna	100.000
HG-BPL2 (vacuna control +)	100.000
No vacunats, infectats	-
No vacunats, no infectats	-

---

Taula 2-2: Recull dels títols de l'assaig de sueroneutralització dels diferents candidats vacunals proposats, els valors es mostren seguint la normativa de la Farmacopea Europea, que invalida els valors inferiors a 10.000 unitats. Cada grup experimental consta de 10 animals i els valors que es mostren són la mitjana de tots els animals.

---

De les conclusions de l'estudi efectuat en animals s'en destaquen:

- Tots els grups d'animals als que se'ls ha administrat alguna de les proteïnes (candidats vacunals) compleixen els requisits exigits per la Farmacopea Europea, en la que s'especifica que el títol de sueroneutralització ha d'ésser superior a 10.000 unitats per a poder ser considerat positiu.
- De les proteïnes experimentals provades, la que ha donat millor resultat pel que fa a la protecció davant de la infecció experimental, ha estat el candidat vacunal VP2, seguit de la poliproteïna, i per últim la VPX.
- La protecció conferida per VP2 és major que la vacuna clàssica.

Els estudis dels candidats vacunals es completen per a poder descriure la dosi vacunal efectiva i la via d'administració. Les conclusions finals que es desprenen de l'estudi defineixen la dosi vacunal de VP2 de 3 µg (tot i que amb 1 µg es produeix resposta immunitària, la concentració d'anticossos neutralitzants disminueix), i es descarta la vacunació per via oral, havent-se de realitzar per via subcutània.

## **2.4. Plantejament del present treball.**

El treball que es presenta a continuació, es centra en explorar la possibilitat de desenvolupar un bioprocés per a la producció d'una vacuna animal, que permeti ser implementat en una planta productiva. Com s'ha explicat en els primers apartats de la introducció, el treball es centrarà en primer lloc, en l'estudi d'un bioprocés comercial d'obtenció d'IBDV, sistema basat en l'obtenció de virus IBD a partir de la infecció de cèl·lules *Vero*. Es tracta d'un sistema que es podria anomenar convencional, i que requereix d'una posterior atenuació dels virus obtinguts per tal de preparar les vacunes. Posteriorment, s'analitzaran tres sistemes diferents alternatius, consistent en l'expressió de la proteïna VP2 recombinant, proteïna de l'envolta del virus capaç d'estimular el sistema immunològic dels animals, en cèl·lules d'insecte (*Sf9*), bacteris (*Escherichia coli*) i llevats (*Pichia pastoris*). La possibilitat d'obtenir VP2 recombinant permetria desenvolupar vacunes més segures tant en manipulació del procés com del producte en sí, i en la seva aplicació, amb la conseqüent disminució dels costos de les instal·lacions industrials.



El treball s'estructura en diferents capítols, cadascun es centra en un dels organismes escollits per a la producció. Els capítols s'inicien en l'estudi i construcció del biocatalitzador (si es necessari), i un cop obtingut es desenvolupen diferents sèries experimentals per a poder fixar les característiques i condicions del cultiu. Inicialment, s'estudiarà les diferents opcions de medis de cultiu per cadascun dels organismes, i un cop s'hagi definit el medi de cultiu que més s'adeqüi, es prosseguirà en l'estudi de diferents estratègies de cultiu, en busca de la que ofereixi més rendibilitat al bioprocés. Tal i com s'ha explicat en apartats anteriors, aquesta tasca va estretament lligada a la necessitat d'explorar les opcions de monitoratge dels cultius que es vulguin desenvolupar, de manera que permetin obtenir informació de l'estat fisiològic i metabòlic del cultiu, i per tant, en facilitin l'optimització de la seva operació a nivell industrial, que a ser possible, ha de ser senzilla i robusta.

El conjunt de l'estudi pretén establir les bases pel desenvolupament d'un nou bioprocés, que permeti realitzar l'anàlisi del bioprocés per a diferents sistemes d'expressió. Es persegueix poder aportar informació suficient basada en l'experiència empírica, per tal de poder analitzar els diferents sistemes estudiats, i disposar d'elements que permetin identificar potencialitats i riscos per cadascun dels cassos, i que al seu temps serveixin per a escollir els millors bioprocessos a seguir desenvolupant.

L'anàlisi comparativa dels diferents sistemes, es planteja a partir del disseny de plantes productives, que es dimensionen a partir de les dades empíriques obtingudes en els capítols en que s'estudien cadascun dels sistemes. Amb l'ajut d'un programari de simulació, es realitza l'anàlisi econòmica per cadascuna de les alternatives, que aportarà informació sobre els diferents bioprocessos i els seus límits productius, així com els costos associats als productes segons el sistema de producció escollit.

## **2.5. Bibliografia.**

Azad, AA; Barrett, SA i Fahey, KJ. 1985. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* 143:35-44.

Azad, AA; Jagadish, MN; Brown, MA i Hudson, PJ. 1987. Deletion mapping and expression in *E. coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161:145-152.

Becht, H i Muller, H. 1991. Infectious bursal disease-B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. *Behring Institute Mitteilungen*:217-225.

Bergeron, B i Chan, P. 2004. *Biotech Industry: A global, economic and financing overview*. John Wiley and Sons Inc. New Jersey.

Casal, I; Garcia, JL; Guisán, JM i Martínez, JM. 2000. *Biotecnología y salud. Serie: Biotecnología en pocas palabras*. Sociedad Española de Biotecnología. (<http://www.sebiot.org>). Madrid.

Cosgrove, AS. 1962. An apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Diseases* 6:385-389.

Dobos, P; Berthiaume, L; Leong, JA; Kibenge, KS; Muller, H i Nicholson, BL. 1995. *Family Birnabiridae. Virus taxonomy*. New York.

Duboë-Laurence, P i Breger, C. 1985. *El libro del amante de la cerveza. El cuerno de la abundancia ediciones*. Palma de Mallorca.

Fahey, KJ; Enry, K i Crooks, J. 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *Journal of General Virology* 70:1473-1481.

Fahey, KJ; O'Donnell, IJ i Azad, AA. 1985a. Characterization by Western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 66:1479-1488.

Fahey, KJ; O'Donnell, IJ i Bagust, TJ. 1985b. Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity in vitro and confers protection on young chickens. *Journal of General Virology* 66:2693-2702.

Glazer, A i Nikaido, H. 1994. *Microbial Biotechnology*. New York: W.H. Freeman and Company. 89-169.

Harrison, RG; Todd, P; Rudge, SR i Petrides, DP. 2003. *Bioseparations Science and Engineering*. Oxford University Press. Oxford.

Hitchner, SB. 1970. Infectivity of Infectious Bursal Disease virus for embryonating eggs. *Poultry Science* 49:511-516.

Jagadish, MN; Staton, VJ; Hudson, PJ i Azad, AA. 1988. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *E. coli* by its own virus-encoded polypeptide. *Journal Virology* 62:1084-1087.

Mundt, E; Beyer, J i Muller, H. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology* 76:437-443.

Pagès-Manté, A; Pujol, P; Durán, D; Fernández, F i Hernando, A. 1991. Estudios clínicos y laboratoriales de una cepa de la enfermedad de Gumboro IBD aislada en Baleares. (<http://www.hipra.com>).

**3. OBJECTIUS.**



### Objectius principals:

Analitzar diferents bioprocessos alternatius de producció d'una vacuna contra la malaltia de Gumboro o Infecció Bursal Disease (IBD) en aus. Aquesta anàlisi es realitzarà en base a tres components fonamentals: el sistema biològic d'expressió, el sistema biotecnològic de cultiu dels biocatalitzadors implicats en cada bioprocés, i finalment, l'anàlisi del bioprocés complet que es pugui definir en cada cas. Així, el que es vol aconseguir en aquest treball és estudiar i entendre les característiques del sistema biològic escollit, i les peculiaritats dels respectius sistemes de cultiu. Les condicions i característiques del cultiu de cada sistema d'expressió s'acaben projectant a nivell del bioprocés productiu final, fet que s'acaba reflectint directament en l'economia del bioprocés, i conseqüentment en la seva viabilitat. D'aquesta anàlisi econòmica se'n podran derivar conclusions sobre la viabilitat i potencialitat de les diferents alternatives estudiades.

### Objectius específics:

Es plantegen cinc grans blocs de treball:

- Estudar el sistema convencional de producció de la vacuna, basat en el cultiu de cèl·lules *Vero* i la seva infecció amb virus IBD.
  
- Estudar sistemes alternatius en base a l'expressió de la proteïna VP2 de l'envolta del virus en tres sistemes diferents:
  - a) Cèl·lules d'insecte, *Sf9*, infectades amb un *baculovirus* recombinant.
  - b) Cèl·lules de llevat, *Pichia pastoris*.
  - c) Cèl·lules bacterianes, *Escherichia coli*.

En tots aquests sistemes cal estudiar, no únicament els sistemes d'expressió, sinó també posar a punt els sistemes de cultiu, i en especial centrar-se en aquelles estratègies que permeten assolir sistemes d'alta densitat cel·lular, per tal de maximitzar la productivitat. Aquest esforç ha de considerar aspectes que van des de la definició dels medis de cultiu, infecció, etc., i fins a la possibilitat de monitoratge i control dels bioprocessos. Pel que fa a aquest darrer aspecte, es planteja una aproximació que es basa en la utilització de sistemes senzills i robusts, que es puguin aplicar de forma fiable en entorns industrials.

- Finalment, es pretén comparar els diferents sistemes estudiats en base a la definició dels corresponents bioprocessos i a la seva anàlisi, també a nivell econòmic, de forma que es pugui arribar a conclusions finals d'aquest estudi comparatiu.

**4. ANÀLISI DEL SISTEMA DE REFERÈNCIA:**  
**OBTENCIÓ D'UNA VACUNA CLÀSSICA**  
**BASADA EN L'EXPANSIÓ DE VIRUS IBD EN**  
**Cè·l·lules *Vero*.**





## **4.1. Introducció.**

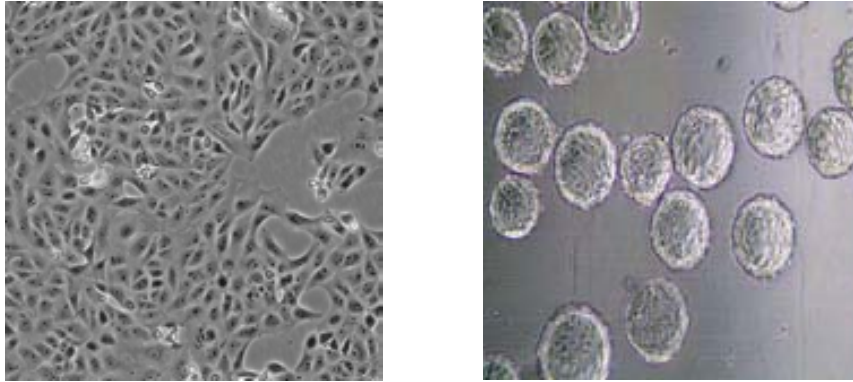
### **4.1.1. Antecedents.**

Una de les fonts més habituals de producció de vacunes víriques a nivell industrial es realitza mitjançant l'expansió del propi virus i la seva posterior inactivació. Per a desenvolupar aquests sistemes cal disposar d'una soca de cèl·lules sensibles a ser infectades pel virus d'interès, que en primer lloc s'han d'expandir fins assolir suficient concentració cel·lular, per tal de produir posteriorment la infecció.

En el cas concret del virus IBD, que de fet és una opció desenvolupada industrialment, esdevindrà la referència o punt de partida escollit en aquest treball. En aquest capítol es planteja estudiar les característiques principals dels dos organismes i de la seva interacció, estudiar la influència d'alguns paràmetres sobre els cultius, i proposar millores. Tots aquests aspectes permetran conèixer més a fons el sistema, basat en les cèl·lules Vero com a cèl·lula receptora, i en la seva infecció amb IBDV.

### **4.1.2. El sistema IBDV-Cèl·lules Vero.**

Les cèl·lules Vero es van aïllar de la zona epitelial del ronyó del Mono Verd Africà (African Green Monkey Kidney, *Cercopithecus aethiops*) per Yasumura i Kawakita al 1962 (Yasumura i Kawakita-1963). Es tracta d'una cèl·lula anclatge-dependent, és a dir, que necessita d'una superfície-suport on adherir-se per tal de créixer en cultiu. Aquest fet, comporta utilitzar sistemes de cultiu que aportin, a més de tots els requeriments nutricionals, la superfície sobre la qual les cèl·lules creixeran adherides. A la Figura 4-1 es mostren dos d'aquests sistemes. En un cas, es realitza el cultiu en estàtic en flascons i les cèl·lules creixen sobre la superfície de la seva base. En l'altre cas, els cultius agitats, s'utilitzen microsuports, partícules que ofereixen molt bona relació superfície/volum, que solen ser emprades en sistemes agitats, on els microsuports amb les cèl·lules adherides es mantenen en suspensió en el medi de cultiu.



---

Figura 4-1: Imatges de cultius de cèl·lules Vero: a l'esquerra cultiu en flascons on les cèl·lules Vero creixen adherides sobre una superfície de la base sense agitació, i a la dreta cultiu sobre microsuports (Cytodex 3) on les cèl·lules creixen sobre superfícies esfèriques que es troben en suspensió en el medi de cultiu (sistemes en agitació).

---

Les cèl·lules Vero han estat emprades àmpliament per a realitzar estudis d'infecció i replicació vírica. Les cèl·lules Vero són sensibles a la infecció per part de SV-40, SV-5, arbovirus, reovirus, adenovirus, poliovirus... La primera utilització de les cèl·lules Vero com a cèl·lula receptora per a la producció de virus per a l'elaboració de vacunes, va ser realitzada per l'Institut Mérieux (actualment Aventis Pasteur) en la dècada dels 80, i va obtenir la llicència a França per a la producció de la vacuna de poliovirus inactivada (IPV) i de la vacuna de poliovirus oral (oral (live) poliovirus vaccine ,vacuna viva) (Montagnon·1989).

Pel que fa a la informació sobre la soca de virus IBD (Infectious Bursal Disease Virus), s'ha utilitzat una soca propietat d'una empresa productiva, emprada en la producció de vacunes convencionals.

### **4.1.3. Medis de cultiu per a cèl·lules animals.**

El cultiu de cèl·lules animals, tant de mamífers com d'insectes, requereix la utilització de medis complexes amb un gran nombre de substrats entre els seus components, ja siguin medis amb composició definida, com indefinida. Habitualment, aquests medis han estat formulats per a operar amb una estratègia de cultiu en discontinu, en què s'addicionen tots els nutrients a l'inici del cultiu i la durada d'aquest depèn del nutrient que s'esgota en primer lloc, si existeix una limitació per substrat, o de la acumulació d'algun subproducte tòxic del metabolisme cel·lular.

Una de les desavantatges principals dels medis indefinits o semidefinits és la presència de components dels quals no es coneix la seva composició en detall, fet que a vegades fa més

complicat l'anàlisi d'aspectes com el metabolisme de les cèl·lules. També els medis indefinits són menys apropiats de cara al monitoratge i control. En aquest capítol es realitza l'estudi amb un medi comercial definit, donat que aquest és l'emprat en els processos de producció que es prenen com a referència.

#### 4.1.4. Sistemes de cultiu.

Una de les problemàtiques del sistema convencional IBDV-cèl·lules Vero, ve associada al tipus de cultiu, i al canvi en l'escala de producció. Tanmateix, un sistema molt habitual en aquest tipus de cultius sobre superfícies són les ampolles rodants. Tot i que resulta ser un sistema molt simple, el seu ús està limitat pel que fa a la producció de volums elevats.

L'ús d'ampolles rodants ha permès aconseguir a partir d'un inòcul víric de  $10^6$  (partícules infectives/mL) una concentració vírica final 10 vegades superior a la inicial, o un índex de replicació víric de 37 (l'índex de replicació es defineix com la relació entre el nombre de virus que s'obtenen per cada cèl·lula infectada), resultats obtinguts en treballs previs. Cal esmentar que aquest índex de replicació vírica no és habitual, sinó més aviat baix si es compara amb l'índex de replicació que s'obté amb altres virus, com ara *baculovirus*, on s'obtenen entre 100 i 1000 vegades la concentració d'infecció (Elias *i col.*:2000), o els *adenovirus*, amb els que s'ha arribat a nivells entre 10.000 i 100.000 virus finals per cèl·lula (Altaras *i col.*:2005).

A partir d'aquesta referència en ampolles rodants, es planteja explorar sistemes de cultiu alternatius que permetin escales superiors. Els sistemes considerats es presenten a la Figura 4-2, que d'esquerra a dreta són: ampolles rodants (sistema de referència), bioreactors i flascons agitats.



---

Figura 4-2: Imatges dels diferents sistemes emprats pel bioprocés per a l'obtenció de virus IBD. D' esquerra a dreta: ampolles rodants, bioreactor Braun B i flascons agitats.

---

L'ampolla rodant consisteix en un sistema de cultiu tancat, on les cèl·lules creixen adherides a les parets d'aquesta. L'ampolla s'introdueix en una estufa o cambra termostatitzada, i es fa rodar sobre ella mateixa contínuament per a aconseguir una millor aeració del medi, i que s'estableixi un contacte intermitent entre les cèl·lules adherides en monocapa i el medi.

Els bioreactors són sistemes de cultiu autònoms, que permeten treballar amb volums elevats. Degut a aquesta característica necessiten d'un mínim de sistemes específics per a l'aeració, l'agitació, la termostatització i el control de pH. Degut a la naturalesa de la línia cel·lular, el cultiu en bioreactor necessita incorporar partícules de microsuports, per tal de proveir de la superfície d'adhesió necessària per a l'adhesió de les cèl·lules.

Finalment, els flascons agitats són un sistema de cultiu que es troba a mig camí entre les ampolles rodants i els bioreactors, i que es vol emprar per a poder estudiar com a pas intermedi en el procés de canvi d'escala. Aquest sistema de cultiu es pot configurar de manera que sigui obert o tancat, segons s'utilitzi un tap no permeable als gasos, o un filtre en una de les boques d'accés. El seu cultiu es desenvolupa a l'interior d'un incubador que permet controlar la temperatura, la humitat i el % CO<sub>2</sub> en la fase gas. Els cultius es realitzen agitats en suspensió (de forma similar als bioreactors) mitjançant una placa d'agitació electromagnètica, i un pèndol que alberga un imant en el seu interior. A la Taula 4-1 es recullen les principals característiques i condicions en que es desenvolupen els cultius segons el tipus de sistema emprat.

	Ampolles rodants	Flascons agitats	Reactors
Superfície	Superfície plana	Microsuports	Microsuports
Tipus cultiu	Estàtic	Agitat	Agitat
Esforç tallant ("shear stress")	No	Mitjà	Elevat
Relació Volum de cultiu (medi) i Superfície d'ancoratge (V/S).	V/S = 0,35 ml/cm <sup>2</sup> (creixement) V/S = 0,12 ml/cm <sup>2</sup> (infecció)	No determinat	No determinat
Control de gasos	Sistema tancat sense aeració	Sistemes oberts, amb control de l'atmosfera gasosa, o tancat	Sistemes amb aeració

Taula 4-1: Comparació de diferents sistemes de cultiu per a la producció de virus IBD en Cèl·lules Vero. Característiques dels cultius en ampolles rodants, flascons agitats i bioreactors.

La metodologia que s'empra es centra en una transició des del sistema de cultiu de referència, fins al cultiu en bioreactor, de manera que es variïn el mínim de variables possibles en cada un dels sistemes que s'explorin. Es comença pel sistema estàtic en flascó, per passar a continuació a sistemes agitats en flascó, i finalment traslladar el bioprocés al sistema de cultiu en bioreactor.

## **4.2. Posada a punt de les tècniques de cultiu i seguiment de la concentració cel·lular en sistemes estàtics.**

El punt de partida d'aquest estudi és el cultiu en un sistema en estàtic, en concret els flascons de cultiu. Donada la característica d'anclatge-dependència d'aquesta línia cel·lular, s'ha d'avaluar una metodologia que permeti realitzar el seguiment del creixement del cultiu. No hi ha doncs, la possibilitat d'extreure una alíquota per a realitzar el recompte cel·lular per a poder avaluar el creixement. En aquest tipus de cultiu s'ha de realitzar un procés de tripsinització, que permet desancorar les cèl·lules de la superfície d'adhesió, per ser recomptades posteriorment. Es planteja doncs, avaluar l'efecte de la tripsinització sobre el desenvolupament del cultiu, amb un experiment en que es realitza el seguiment de cultius que es tripsinitzen diàriament (per cada mostra que es vol recomptar), i es compara amb el seguiment d'una metodologia de cultius en el que es treballa amb una sèrie de múltiples rèpliques de cultius, en la que es sacrifica un cultiu per cada mostra avaluada.

Es duen a terme experiments d'una banda en tres flascons de 25 cm<sup>2</sup>, i d'altra banda en dues plaques de 6 pous de 9,2 cm<sup>2</sup>. L'inòcul en tots ells és de 1·10<sup>4</sup> cèl·lules/cm<sup>2</sup>. El volum total de medi de cultiu en el cas de la placa de 6 pous és de 1,5 ml, mentre que el volum del flascó de 25 cm<sup>2</sup> és de 4 ml.

El seguiment es realitza cada 24 hores, i és diferent segons cadascun dels casos: pels flascons s'extreu el medi de cultiu, a continuació es realitza el protocol de tripsinització de cadascun d'ells, i es procedeix al recompte cel·lular. Posteriorment, i un cop centrifugades les cèl·lules anteriorment tripsinitzades (1000xg 5 minuts), es retornen al seu corresponent flascó amb el mateix medi de cultiu. Pel seguiment de les plaques de 6 pous es realitza la

tripsinització (sacrificant un pou diferent per cada mostra) cada 24 hores, i es procedeix al recompte cel·lular.

A la Figura 4-3 es mostren els perfils de concentració de cèl·lules totals que s'han obtingut en els diferents sistemes. S'observa en ella, que els cultius que han estat tripsinitzats consecutivament per tal de recomptar les cèl·lules viables, el procés de tripsinització afecta notablement al creixement, i després de dues tripsinitzacions, el cultiu no disposa de prou temps per a recuperar-se i conseqüentment, el nombre de cèl·lules viables decau. Aquest efecte és degut a la degradació que pateixen les proteïnes d'adhesió de la membrana, les quals són imprescindibles per l'adhesió, sense la qual no es possible la divisió cel·lular en les línies anclatge-dependents. Per tant, es conclou que no és possible seguir la concentració cel·lular en un sol cultiu, necessitant-se un nombre de rèpliques de cultius independents en paral·lel igual que el nombre de mostres que es vulguin avaluar.

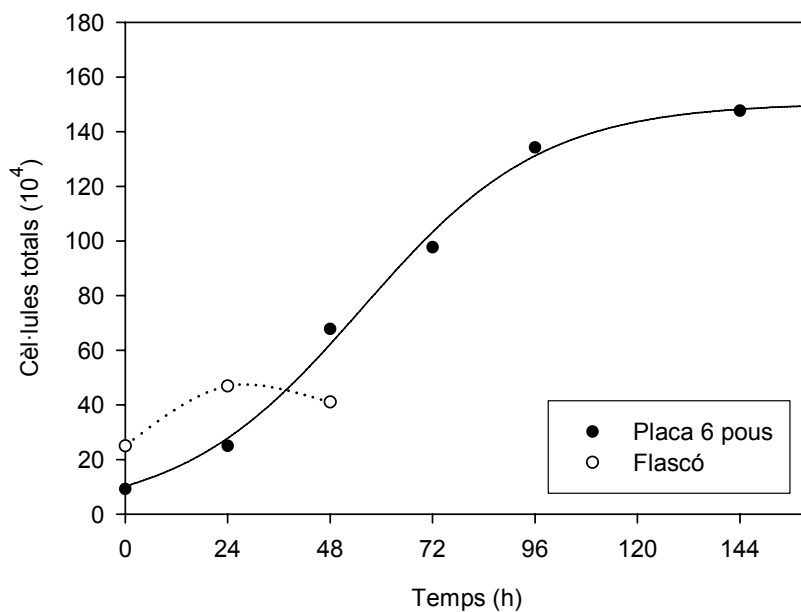


Figura 4-3: Perfils de concentració de cèl·lules Vero creixent en plaques de 6 pous (6 mostres independents) i en flascó de cultiu (tripsinització del cultiu per cada mostra).

Aquest sistema implica, per tant, més esforç experimental, i suposa que tots els cultius que es realitzen en paral·lel segueixin la mateixa evolució, fet que comporta la necessitat d'establir de forma molt acurada, idèntiques condicions en tots els experiments (volums de cultiu, concentració i viabilitat de l'inòcul,...).

### **4.3. Parametrització de les condicions de cultiu: relació V/S i nivells de CO<sub>2</sub>.**

#### **4.3.1. Estudi de la relació V/S en cultius estàtics.**

L'estudi d'aquest primer paràmetre sorgeix de la idea de que es pugui produir un limitació de substrats en el bioprocés, que pogués desembocar a una ineficiència de l'infecció vírica i consegüentment de la replicació. Per aquest motiu, es dissenya un experiment que es durà a terme en flascons de cultiu de 25 cm<sup>2</sup> amb tap sense filtre, per a mantenir el sistema de cultiu estàtic i sense aeració. D'aquesta manera, des del punt de vista de l'intercanvi de gasos a l'incubador de CO<sub>2</sub>, es reproduïxen les mateixes condicions que en els experiments en ampolles rodants, que, com s'ha assenyalat anteriorment, són el sistema de referència industrial en el cas concret que s'avalua. Es sembren 10 flascons amb un volum de 8,8 ml (relació V/S=0,35), i 10 flascons amb 3 ml de medi MEMG amb un 10% de FBS. L'inòcul que s'utilitza és de  $2,5 \cdot 10^4$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>, igual per tots els cultius, i els experiments es realitzen en un incubador amb una humitat del 95% a 37°C.

La presa de mostra per procedir al recompte cel·lular es realitza aproximadament cada 24 hores, sacrificant un flascó de cada tipus per mostra, i al quart dia de cultiu (quan ja normalment s'assoleix la confluència en monocapa) es procedeix a realitzar la infecció amb el recanvi de medi (MEMG sense sèrum), mantenint les relacions V/S que s'han definit per a l'etapa de creixement. Les mostres de les titulacions es realitzen a l'inici de la infecció, al quart, i sisè dia, segons els protocols corresponents. La Figura 4-4 mostra els perfils dels cultius que s'han obtingut, tant a nivell de concentració cel·lular, com vírica.



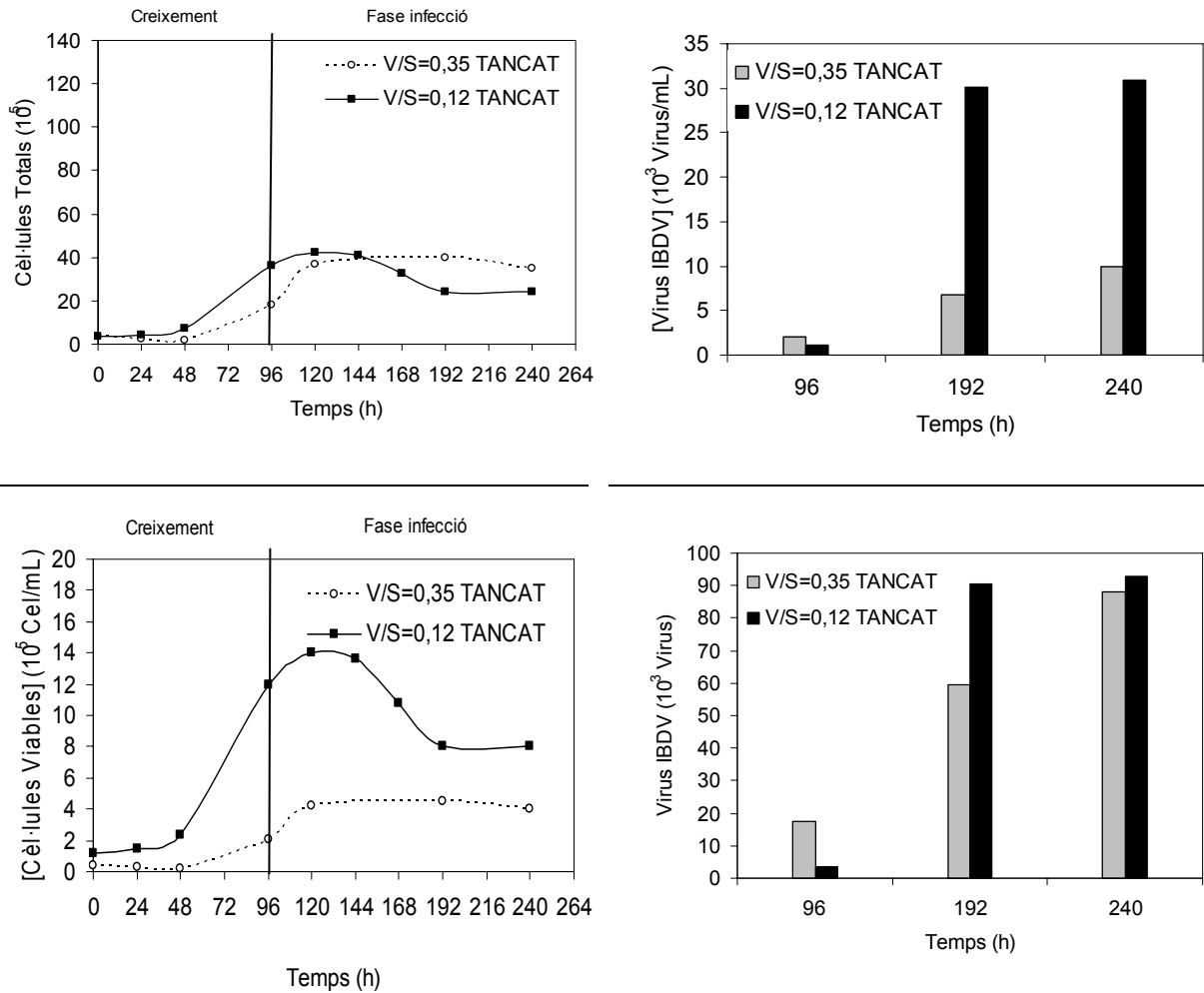


Figura 4-4: Estudi de l'efecte de la relació V/S en cultius estàtics de cèl·lules *Vero* sense intercanvi de gasos (flascons tancats). S'estudien els casos de V/S=0,35 i V/S=0,12. A l'esquerra es mostren els perfils de l'evolució de les cèl·lules totals (part superior) i de la concentració de cèl·lules viables (part inferior). A la dreta es mostren les evolucions de la concentració del títol víric (part superior) i la quantitat de virus totals (part inferior). MOIs de  $1 \cdot 10^{-2}$  per V/S=0,35 i de  $1 \cdot 10^{-3}$  per la relació de V/S=0,12.

Els resultats obtinguts mostren com en els dos casos de relacions diferents de V/S assoleixen la mateixa quantitat de cèl·lules viables totals ( $4 \cdot 10^6$  cèl·lules, figura superior esquerra), tot i que sembla que per la relació V/S= 0,35 l'aparició del màxim pateix un retràs respecte als cultius amb V/S=0,12. Aquest retràs podria ser degut a la menor velocitat de transferència d'oxigen degut a l'augment de l'alçada del medi de cultiu sobre la monocapa cel·lular, causant un gradient de la concentració d'oxigen dissolt entre la superfície d'adherència, i la interfase líquid-gas. Per altra banda, la limitació del cultiu, almenys pel cas de major proporció de medi (V/S=0,35), no pot ser deguda a un exhauriment de substrats ja que aquests es troben en major quantitat que pel cas de V/S=0,12, i el creixement és idèntic.

Per tant, el més probable és que els cultius assoleixin el màxim de concentració quan s'exhaureix l'O<sub>2</sub>, o bé quan es satura la superfície d'adherència de la placa.

Donat que s'assoleix una quantitat de cèl·lules idèntica, degut al menor volum de medi emprat en el cas de V/S=0,12, la concentració cel·lular referida al volum de medi és major en aquest cas, i per tant, hi ha un major aprofitament del medi de cultiu.

Un efecte similar es pot observar en el seguiment de la concentració de virus. La concentració vírica en el cas de menor proporció de medi de cultiu (V/S de 0,12) assoleix un valor de  $30 \cdot 10^3$  partícules infectives per mL. En canvi l'altre cas (V/S de 0,35), s'obté una concentració de partícules infectives tres vegades menor (inversament proporcional al augment de medi de cultiu). En canvi, la quantitat de partícules infectives totals al final del cultiu és similar, i per tant l'índex de replicació pel cas de V/S=0,35 és menor, és a dir, l'eficiència baixa al augmentar el volum de medi per les característiques del cultiu. Aquest fet pot ser degut a la major dificultat d'interacció virus-cèl·lula deguda a l'augment del gruix de la capa de medi.

Finalment, degut a la baixa MOI que s'ha utilitzat, de l'ordre de  $10^{-2}$ , i assumint que cada virus infecta una cèl·lula, es pot pensar que aquest índex de replicació vírica (virus que es produeixen per cèl·lula infectada) és proper al màxim que es pot assolir, ja que en el cas de V/S=0,12 és de 27 virus/cèl·lula infectada, i el cultiu en ampolla rodant de referència és similar (37 virus/cèl·lula infectada). En canvi, en el cas de V/S=0,35 l'índex de replicació baixa fins a un valor proper 5. Així doncs, el resultat mostra que tot i que es canviï de sistema de cultiu, es conserva aproximadament el comportament respecte el cultiu de referència en ampolla rodant.

A partir d'aquests primers resultats, es realitza una nova sèrie experimental en que es conserva la metodologia anteriorment exposada, però es varia únicament el tipus de tap del flascó utilitzat, emprant taps amb filtre que permeten intercanviar els gasos amb l'exterior. D'aquesta manera, es vol comprovar si els experiments anteriors estaven limitats per oxigen. Es realitzen deu cultius amb cadascuna de les relacions de volum-superfície, i es cultiven els 20 flascons en un incubador amb un percentatge a la fase gas del 5% de CO<sub>2</sub>, una humitat del 95% i una temperatura de 37°C. Els resultats que s'obtenen es mostren a la Figura 4-5.

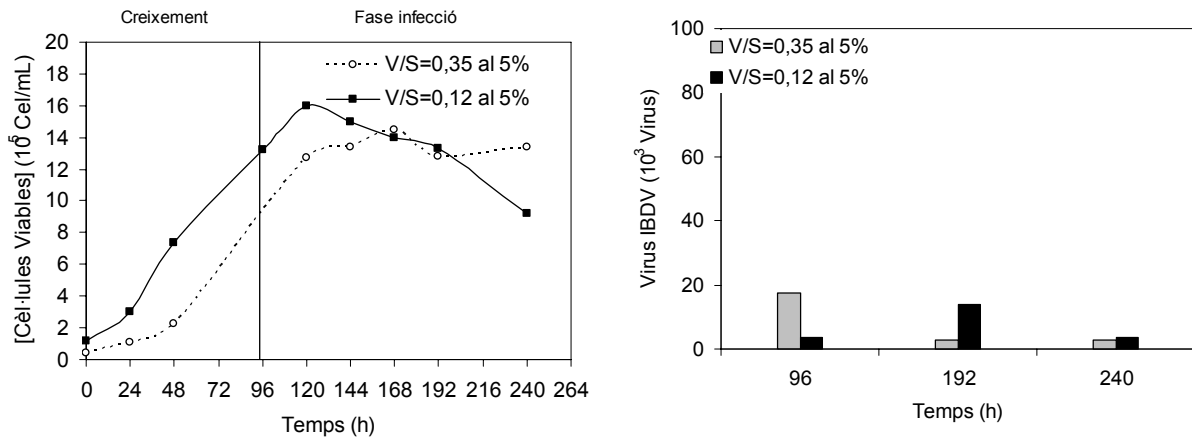
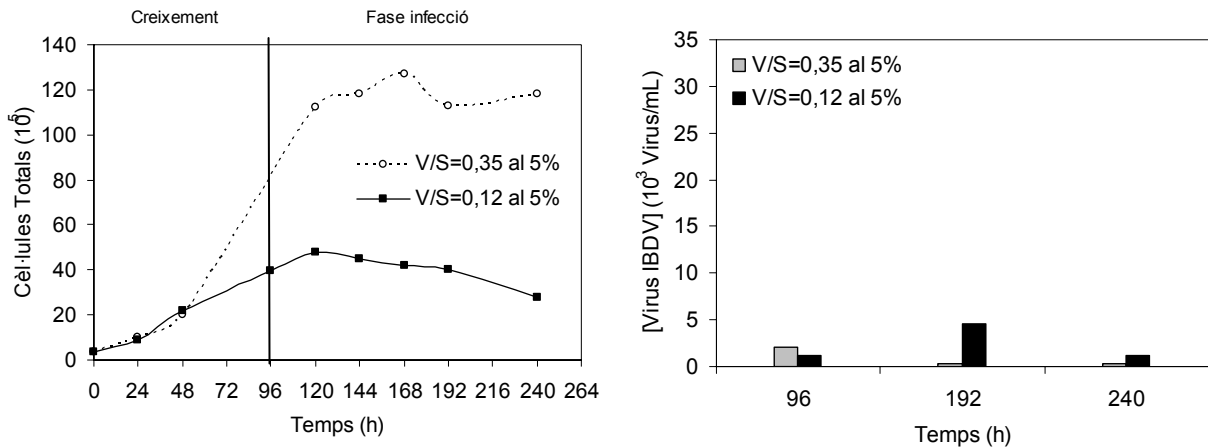


Figura 4-5: Estudi de l'efecte de la relació V/S en cultius estàtics de cèl·lules Vero amb intercanvi de gasos amb una atmosfera controlada amb un 5% de  $CO_2$ . S'estudien els casos de V/S=0,35 i V/S=0,12. A l'esquerra es mostren els perfils de cèl·lules totals (part superior) i de la concentració de cèl·lules viables. A la dreta es mostren les evolucions de la concentració del títol víric (part superior) i de la quantitat de virus totals (part inferior). MOIs de  $10^{-2}$ .

Els perfils de cèl·lules viables mostren clarament que el motiu de la limitació del creixement cel·lular en l'experiment anterior era la manca d'oxigenació del sistema de cultiu, superada amb la introducció del tap amb filtre, ja que la quantitat de cèl·lules totals que s'assoleix en el cas de V/S=0,35 ( $12 \cdot 10^6$  cèl·lules) triplica el nivell de assolit en el cas de V/S=0,12 ( $4 \cdot 10^6$  cèl·lules), és a dir, que l'augment en la quantitat de cèl·lules és proporcional a l'augment de la quantitat de medi, i per tant, de quantitat de substrats. Es descarta doncs, la hipòtesi de que el factor limitant fos la superfície disponible. Aquest augment proporcional es veu clarament reflexat en al corba de concentració cel·lular, ja que en els dos casos s'arriba aproximadament a  $15 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL. El fet de que la concentració cel·lular final sigui la

mateixa en els dos casos, fa arribar a la conclusió de que aquest és el límit de concentració cel·lular (referida al volum del cultiu) que es pot assolir amb el medi emprat. D'altra banda, aquest és un nivell de concentració força habitual en cultius de cèl·lules animals en sistemes similars. És important tenir en compte aquest exhauriment del medi de cultiu de cara a la segona part del procés, la infecció vírica, en la que caldrà aportar nous nutrients per a garantir que durant el procés d'infecció no hi hagi cap limitació. Per tant, en el moment de la infecció és important realitzar un recanvi de medi, com s'ha fet en els casos anteriors.

Un altre aspecte que es desprèn de l'experiment realitzat, és el de la superconfluència i l'absència de la inhibició del creixement cel·lular per contacte entre les cèl·lules sobre la superfície del flascó. Una observació amb microscopi del flascó, mostra com el flascó amb una relació V/S = 0,12 assoleix una total confluència, però aquest fet no impedeix que el cas del cultiu amb major quantitat de medi (V/S = 0,35), continuï desenvolupant-se i creixent més enllà de la confluència del cultiu en monocapa. Aquest creixement cel·lular en súper-confluència, tot i que resulta positiu per l'absència d'inhibició del creixement, pot presentar limitacions a l'hora de la infecció, donat que es pot limitar l'accessibilitat de les cèl·lules per part del virus.

No obstant, el que resulta més rellevant de l'experiment és que en cap dels dos casos es produeix un augment de la concentració de partícules víriques, és a dir, que la infecció vírica no ha progressat adequadament. L'única diferència entre l'experiment anterior i el present, és la capacitat d'intercanvi de gasos amb una atmosfera controlada al 5% de CO<sub>2</sub> amb que s'ha dotat el sistema de cultiu, fet que té una influència directe en la pCO<sub>2</sub> i en el pH del medi de cultiu.

En les línies cel·lulars de mamífers, s'ha descrit que poden produir-se canvis en la glicosilació i en les modificacions postransduccionals de les proteïnes de membrana segons la concentració de pCO<sub>2</sub> i del pH del medi de cultiu (Zanghi *i col.* 2000), i ser aquestes incompletes o diferents al treballar a baixes concentracions de pCO<sub>2</sub>. Altres estudis (Ogawa *i col.* 1998) han determinat que la presència de receptors de membrana amb un patró de glicosilació determinat i específic del virus, són essencials per a la penetració del virus en les cèl·lules de mamífers. Tenint en compte aquests resultats es planteja la hipòtesis de l'efecte d'una elevada pCO<sub>2</sub> sobre les modificacions postransduccionals, podrien afavorir la infecció del virus IBD. En el conjunt de les línies cel·lulars de mamífers, és habitual treballar a concentracions mínimes del 5%, establint-se també concentracions superiors al 15% de CO<sub>2</sub> en la fase gas.

Els cultius realitzats fins el moment, tant en ampolles rodants (cultiu de referència industrial), com en flascons de cultiu (en els que s'ha pogut reproduir els resultats d'infecció), han estat sistemes estancs, és a dir, sense intercanvi de gasos. Aquest impedeix conèixer la concentració de  $p\text{CO}_2$  que hi ha en aquests cultius, ja que en un inici no hi ha  $\text{CO}_2$  al flascó o a l'ampolla, però a mesura que es desenvolupa el cultiu, i com a conseqüència del metabolisme aerobi el  $\text{CO}_2$  s'acumula en el cultiu, però es desconeix fins a quins nivells. Per tant, de l'anàlisi dels darrers experiments, i de la manca d'infecció viral, es conclou que cal aprofundir en la quantificació dels nivells de  $\text{CO}_2$  de la fase gas en els sistemes de cultiu en estàtic.

### **4.3.2. Efecte del percentatge de $\text{CO}_2$ en la fase gas dels cultius estàtics en incubador.**

A partir de les observacions fetes en l'apartat anterior, es planteja un nou experiment, en que es persegueix un augment de la concentració de  $\text{CO}_2$  en els cultius en flascó. En concret, i en funció de la informació bibliogràfica, es fixa la proporció del 13% de  $\text{CO}_2$  en l'atmosfera de l'incubador on es realitzen els cultius.

L'incubador es posa a punt el dia abans de l'experiment per a assegurar que assoleixi les condicions determinades, i els cultius no puguin veure's influenciats per les desviacions ocasionades pel sistema de control al realitzar el canvi de consigna. Es descarta la possibilitat de treballar en condicions més elevades de  $\text{CO}_2$  per la dificultat de mantenir les condicions de l'incubador.

L'experiment es duu a terme en flascons de cultiu de  $25\text{ cm}^2$  amb taps amb filtre, per a poder mantenir la concentració de  $p\text{CO}_2$  constant a partir de l'intercanvi de gasos amb l'atmosfera controlada de l'incubador (Figura 4-6). Com en els experiments anteriors, es realitzen els cultius en paral·lel, i per cada mostra es sacrifica un dels cultius per a poder fer els anàlisis de concentració cel·lular. En total s'utilitzen 10 flascons amb un volum de 8,8 ml (relació  $V/S=0,35$ ) i 10 flascons amb un volum de 3 ml (relació  $V/S=0,12$ ) de medi MEMG al 10% de FBS. L'inòcul que s'utilitza és de  $2,5 \cdot 10^4$  cèl·lules/ $\text{cm}^2$ , igual per tots els casos. En la infecció es realitza el recanvi de medi amb MEMG sense sèrum.

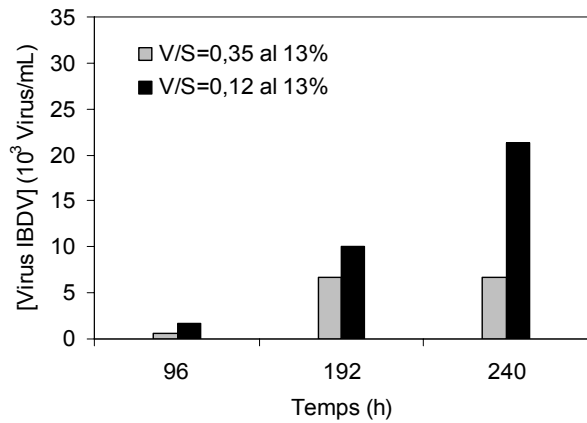
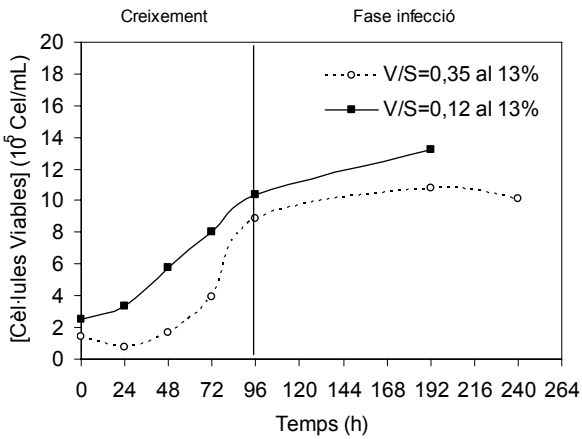
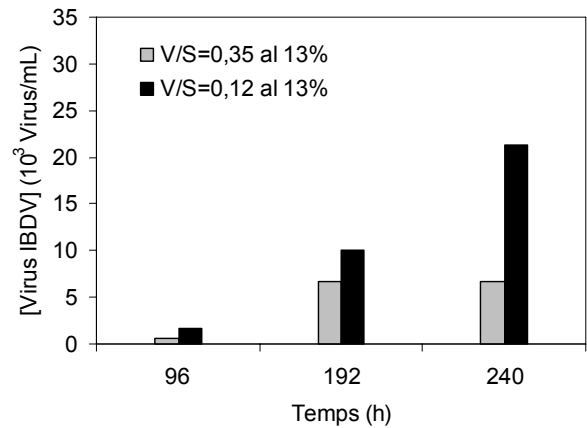
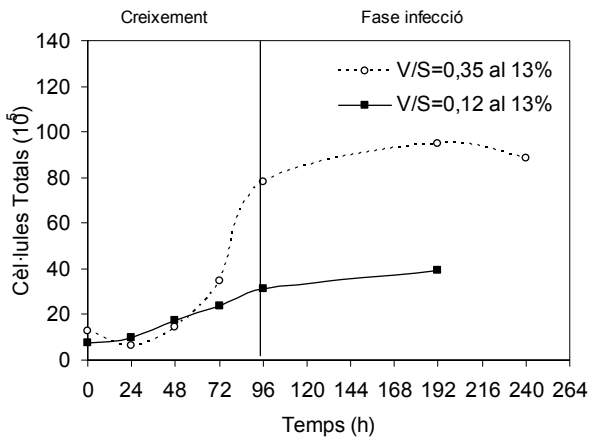


Figura 4-6: Estudi de l'efecte de la relació V/S en cultius estàtics de cèl·lules Vero amb intercanvi de gasos amb una atmosfera controlada amb el 13% de CO<sub>2</sub>. S'estudien els casos de V/S=0,35 i V/S=0,12. A l'esquerra es mostren els perfils de cèl·lules totals (part superior) i de la concentració de cèl·lules viables (part inferior). A la dreta es mostren les evolucions de la concentració del títol víric (part superior) i de la quantitat de virus totals (part inferior). MOIs de 10<sup>-3</sup>.

Els resultats es presenten a la Figura 4-6. Tant pel que fa a la quantitat total de cèl·lules aconseguida per les dues relacions V/S de 0,12 i 0,35 (valors de  $4 \cdot 10^6$  i  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules respectivament), com pel que fa a la concentració cel·lular, arriben a valors del mateix ordre dels que s'havien observat en el cas d'incubar els cultius en una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Així doncs, l'augment de la concentració de CO<sub>2</sub> no causa cap efecte negatiu sobre el creixement dels cultius de la soca de cèl·lules Vero. Per altra banda, es reafirma que el límit de concentració volumètrica que el medi MEMG pot suportar en aquestes condicions de cultiu és situa al voltant de  $15 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL.

Aquests resultats confirmen les conclusions que s'han extret dels últims apartats, en que la limitació del cultiu, una vegada es permet l'intercanvi de gasos amb una atmosfera controlada, deixa de ser causada per la manca d'oxigenació, i la limitació del cultiu esdevé a causa de l'esgotament dels substrats.

Es pot afirmar que l'augment de CO<sub>2</sub> atmosfèric, i per tant del pCO<sub>2</sub> dissolt, millora l'efectivitat infectiva del virus IBD sobre la línia de cèl·lules *Vero*. Tot i la millora en el títol de concentració de partícules infectives que s'ha aconseguit emprant una atmosfera amb un 13% de CO<sub>2</sub>, el valor de l'índex de replicació ha disminuït, situant-se en la generació de 13 partícules infectives per cèl·lula infectada, en el cas que s'utilitza una relació V/S=0,12, i en el cas de V/S=0,35, aquest valor encara és menor (aconseguint-se un índex de replicació de 10) resultat, que ja s'havia pogut observar en el cas de l'experiment realitzat en flascons tancats sense intercanvi de gasos. Com s'ha comentat anteriorment, aquest fet pot ser degut a la major dificultat d'interacció entre el virus i la cèl·lula al augmentar el gruix de la capa de líquid sobre la monocapa adherida de cèl·lules.

Els resultats obtinguts fins al moment en cultius estàtics en flascó, permeten descriure uns criteris inicials a l'hora de plantejar la realització d'experiments en sistemes agitats (flascons agitats com a etapa a petita escala i bioreactors com a sistema industrial). En general s'ha observat que una relació de V/S massa elevada provoca el creixement en múltiples capes (súperconfluència), i la possible pèrdua de l'eficiència d'infecció. També s'ha observat que s'ha d'evitar concentracions baixes de pCO<sub>2</sub>. Aquest, resultarà un fet rellevant en el cas de bioreactors en els que es bombolleja una fase gas (normalment per a aportar O<sub>2</sub>), i en que de forma simultània s'hi pot produir una desabsorció del CO<sub>2</sub> de la fase líquida, el que forçarà a entrar un corrent d'aeració amb una barreja de aire i CO<sub>2</sub>.

### **4.3.3. Cultius agitats amb relació V/S=0,12, i un 13% de CO<sub>2</sub> en la fase gas**

Els sistemes agitats són l'opció a desenvolupar quan cal augmentar els volums de producció i no es vol augmentar de forma lineal el nombre d'unitats de sistemes estàtics (el que comporta un requeriment elevat de recursos humans). En aquests casos, per tal de subministrar suficient superfície d'adherència a les cèl·lules en un volum relativament petit, s'utilitzen partícules de microsuports. En el present cas s'utilitza Cytodex 3 (veure Materials i Mètodes), el qual té una relació superfície-massa de 2700 cm<sup>2</sup>/g. Es fixa la relació V/S=0,12

que implica una concentració de microsuport necessària d'aproximadament 3 g/L de Cytodex 3.

En bioreactors, degut a la disminució de la superfície d'interfície entre la fase líquida i la fase gas en relació al volum de cultiu, resulta necessari emprar un sistema d'aeració. Aquest fet descarta l'opció de realitzar cultius estancs sense intercanvi de gasos, per tant aquesta alternativa s'abandona per no ser factible d'implementar posteriorment en un bioreactor convencional.

En el present apartat s'estudia el cultiu agitat emprant flascons agitats, com a pas intermedi per a arribar a desenvolupar cultius en bioreactor, on les partícules de Cytodex 3 és mantenen en suspensió. L'experiment es desenvolupa en un flascó agitat de 175 ml. Les partícules de Cytodex 3 s'hidraten en una solució de PBS, en els mateixos flascons, i a continuació es procedeix a l'esterilització per calor humit de tot el sistema. Una vegada esterilitzat, es retira el PBS i s'introdueixen els corresponents 41,6 ml de medi MEMG amb un 10% de FBS. L'inòcul es manté igual que en els experiments anteriors,  $2,5 \cdot 10^4$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>, i el cultiu es realitza en el interior d'un incubador al 13% de CO<sub>2</sub>, una humitat del 95% i una temperatura de 37 °C. L'agitació es manté a la velocitat mínima que permet mantenir les partícules de microsuports en suspensió (40 rpm). De manera similar a la metodologia utilitzada en la resta de cultius, al quart dia es procedeix a la retirada del medi exhaurit i a la infecció amb medi fresc. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 4-7.

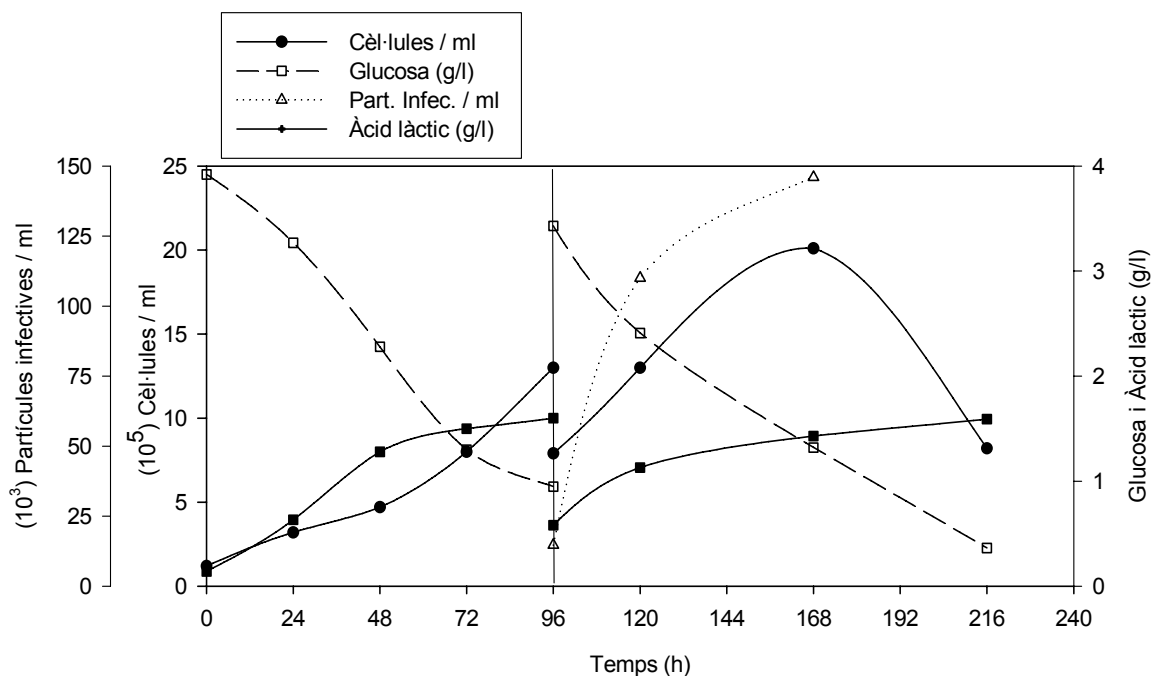


Figura 4-7: Perfil de concentració cel·lular, concentració de glucosa, concentració de lactat, i producció de partícules infectives en cultius de cèl·lules Vero en flascons agitats creixent sobre microsuports (cytodex 3) a una relació V/S=0,12. Els cultius s'han realitzat amb un percentatge de CO<sub>2</sub> en la fase gas del 13%. Infecció en virus IBD a una MOI de 0,02 virus/cèl·lula.



El perfil de la concentració de cèl·lules viables parteix d'un inòcul de  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL, i durant la fase de creixement la concentració cel·lular augmenta fins a  $12,5 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL. En aquest moment es procedeix a la infecció amb una MOI de 0,02 virus/cèl·lula, que representa una concentració vírica de  $1,5 \cdot 10^4$  virus/mL, i s'efectua un recanvi de medi que proporciona nutrients suficients per assolir un màxim de concentració proper  $20 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL, valor superior al que s'ha pogut observar en els cultius estàtics.

En aquest experiment es fa també un seguiment de les concentracions de glucosa i lactat, per tal de tenir uns indicadors bàsics del metabolisme cel·lular i estudiar l'evolució de l'acumulació del lactat (metabòlit secundari), potencialment tòxic a altes concentracions per a les cèl·lules animals (Sanfeliu·1995). A la Figura 4-8 es mostra el mecanisme que descriu la generació del lactat en les cèl·lules animals. La glucosa, principal font de carboni i energia es metabolitza per la via de la glicòlisi fins a piruvat, en la que es genera NADH, i el piruvat pot ser oxidat fins a  $\text{CO}_2$  via el cicle dels àcids tricarboxílics.

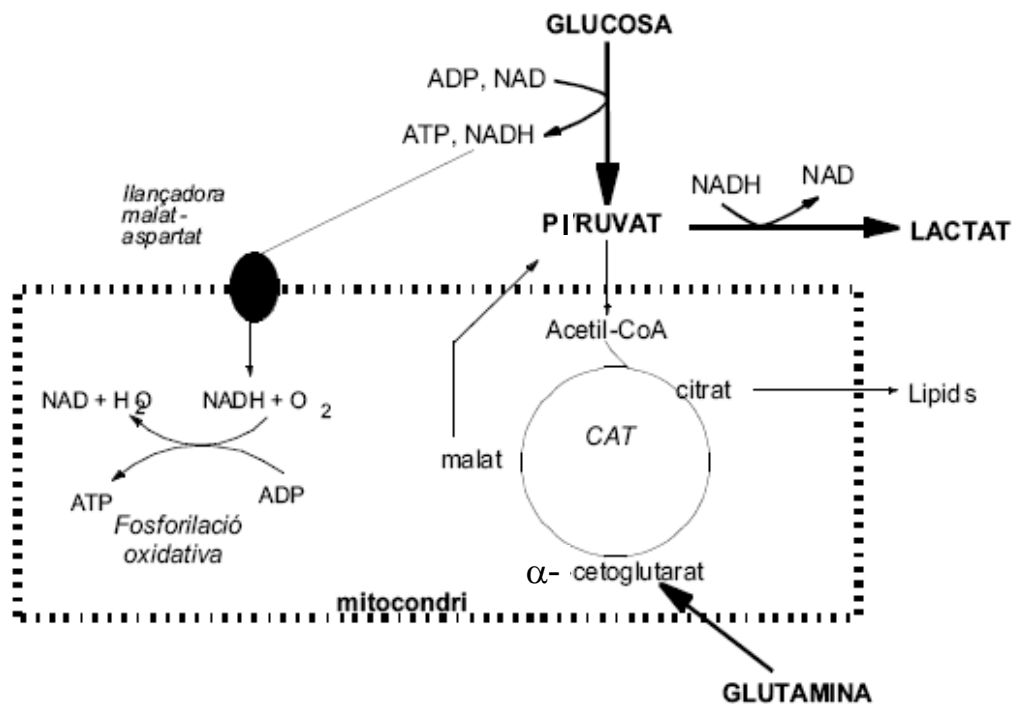


Figura 4-8: Esquema simplificat del metabolisme central de les cèl·lules animals, on es mostra la regeneració del NADH a NAD per mitjà de la conversió del piruvat a lactat.

Per mantenir la via de la glicòlisi activa és necessari regenerar aquest NADH format a  $\text{NAD}^+$ . La cinètica d'aquest mecanisme està fortament limitat per la baixa velocitat de transport del NADH a l'interior del mitocondri, de manera que la cèl·lula fa ús d'un sistema alternatiu per

a la regeneració del NADH, basat en la reacció de piruvat a lactat en el citoplasma. Aquesta via és molt menys rendible ja que s'excreta un subproducte d'oxidació incompleta, el lactat, i conseqüentment el piruvat no pot ser oxidat fins a CO<sub>2</sub>

Inicialment, el medi de cultiu té una concentració de 4 g/L de glucosa que disminueix fins a 1 g/L en el moment del recanvi de medi, quantitat suficient per a garantir que no hi hagi una limitació en el brou de cultiu. Amb el recanvi de medi, la concentració de glucosa es recupera i posteriorment torna a disminuir fins a valors propers a 0,3 g/L. Així doncs, no s'observa una limitació de la font de carboni i energia.

La concentració vírica que s'assoleix és de  $1,47 \cdot 10^5$  partícules infectives/mL, que comporta un augment de la concentració vírica respecte l'inici de la infecció de 10 vegades. Si es compara amb el valor de l'índex de replicació vírica que s'ha obtingut en els cultius en les mateixes condicions però en cultiu estàtic (amb un percentatge de CO<sub>2</sub> a la fase gas del 13%), s'observa que el fet de canviar les característiques no afecta notòriament els valors obtinguts anteriorment, passant d'un valor d'índex de replicació de 13 virus/cèl·lula infectada en el cas dels flascons, a 10 virus/cèl·lula infectada en els cultius en flascons agitats. Donada la major capacitat de producció dels sistema agitat, es continua estudiant el seu desenvolupament. Un dels factors que apunta ser important a l'hora d'haver pogut recuperar els nivells habituals de replicació vírica en el sistema, és l'increment del percentatge de CO<sub>2</sub> a la fase gas del cultiu. Per aquest motiu es considera interessant estudiar amb més detall aquesta variable, per a poder ser implementada en cultius en bioreactor.

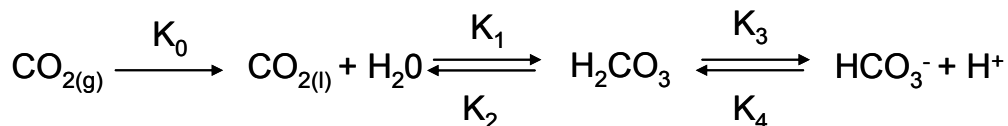
#### **4.4. Cultiu en bioreactor. Sistema indirecte pel manteniment del CO<sub>2</sub> dissolt, basat en la mesura del pH.**

Els resultats que s'han obtingut als apartats anteriors permeten explorar el procés en bioreactor de 2 litres, mantenint paràmetres prèviament definits pel que fa a la relació volum de medi respecte la superfície disponible de  $V/S=0,12$ , i la pCO<sub>2</sub> que hi havia quan la concentració de CO<sub>2</sub> a l'atmosfera de l'incubador era del 13% (que no s'ha quantificat), per a la producció de IBDV mitjançant la infecció de cèl·lules Vero.

No obstant, el canvi de sistema obliga a posar a punt una mesura indirecta pel manteniment estable de la concentració de pCO<sub>2</sub>, ja que aquest paràmetre ha estat descrit

com a clau per aconseguir que hi hagi infecció, i en els cultius en bioreactor no es pot regular directament l'atmosfera de CO<sub>2</sub>. La problemàtica d'aquesta aproximació recau en la poca disponibilitat de sondes de pCO<sub>2</sub> comercials, i en la necessitat de no introduir canvis massa substancials en els aspectes de monitoratge i control, que facilitin així la seva incorporació en els sistemes productius ja existents, molts dels quals han hagut de superar processos de validació per part d'agències de qualitat. No obstant, la bibliografia recull diferents sistemes que s'han desenvolupat per diferents grups per a realitzar el monitoratge la pCO<sub>2</sub>. Es destaquen l'ús d'espectrofotometria de masses per a la quantificació de CO<sub>2</sub> al corrent de sortida de gasos, que permet determinar tant la concentració CO<sub>2</sub> dissolt, com la seva producció (Frahm *i col.*·2002), així com l'ús de sondes de pCO<sub>2</sub> òptiques no invasives (Ge *i col.*·2005). En aquest treball, d'acord amb la voluntat de desenvolupar sistemes que es puguin incorporar de forma ràpida a processos ja existents, s'ha optat per desenvolupar una solució senzilla tot i que indirecte, i que es basa en l'ús de les sondes i mesures ja existents en els sistemes productius en bioreactor, en concret la mesura de pH.

S'aborda doncs, la possibilitat de mantenir constant el percentatge de CO<sub>2</sub> en el bioreactor mitjançant el seguiment de forma indirecte i fora de línia, emprant el coneixement de les característiques i la composició del sistema de tamponament del medi de cultiu (que en el cas de cultiu cel·lular acostuma a utilitzar el bicarbonat/CO<sub>2</sub> com a tamponador de pH del medi), tal i com mostra la Figura 4-9.



---

Figura 4-9 Esquema dels equilibris que s'estableixen en la solubilització del CO<sub>2</sub> en aigua, i la seva relació d'equilibri amb el bicarbonat, que permet controlar el pH del medi.

---

L'evolució del pH en aquest sistema ha de tenir en compte una altra espècie, l'àcid làctic. El metabolisme descrit en les diferents línies emprades en cultiu cel·lular, i sobretot en els cultius de cèl·lules de mamífer, provoca una acumulació d'àcid làctic com a subproducte de l'oxidació incompleta de la font de carboni. Considerant aquesta característica, es planteja l'estudi de l'efecte conjugat del CO<sub>2</sub> dissolt i de l'àcid làctic sobre el valor del pH. L'experiment consisteix en preparar diferents solucions de medi MEMG fresc amb diferents concentracions d'àcid làctic (des de 0 fins a 4 g/L), i mantenint-les en incubadors de CO<sub>2</sub> consignats al 5, 9, 13 i 16 % de CO<sub>2</sub> en la fase gas durant un període de 12 hores. Posteriorment, es mesura el pH que ha assolit cadascuna de les solucions. Els resultats es mostren a la Figura 4-10, on es pot observar per cadascun dels percentatges de CO<sub>2</sub> a la fase gas una relació euclidiana, és a dir

lineal, entre al concentració de àcid làctic i el pH del medi, fet que indica que s'ha arribat a un valor constant de  $p\text{CO}_2$ . Aquesta relació lineal té un límit situat aproximadament al voltant de 3g/L d'àcid làctic, on es perd la linealitat. No obstant, no s'ha assolit en cap dels experiments realitzats una concentració propera a aquesta magnitud, per tant es pot afirmar que dins del rang de treball, la relació es manté lineal.

La correlació gràfica de la Figura 4-10, mostra la interdependència entre les tres variables: percentatge de  $\text{CO}_2$  en la fase gas (en equilibri amb la  $p\text{CO}_2$  a la fase líquida), pH i concentració d'àcid làctic. Tenint en compte que el bioreactor amb el que es treballa i la seva unitat de control digital (DCU) disposa de mesura en línia del pH, es planteja desenvolupar un sistema que de manera indirecta permeti relacionar les variacions de pH, i la mesura de la concentració d'àcid làctic, amb les variacions de la concentració de  $p\text{CO}_2$  dissolt en el medi, al seu temps funció del percentatge de  $\text{CO}_2$  a la fase gas.

Per poder realitzar aquest tipus d'aproximació, caldria que l'efecte sobre la davallada del pH provocada per la concentració d'àcid làctic o de  $p\text{CO}_2$  al medi de cultiu, fos independent.

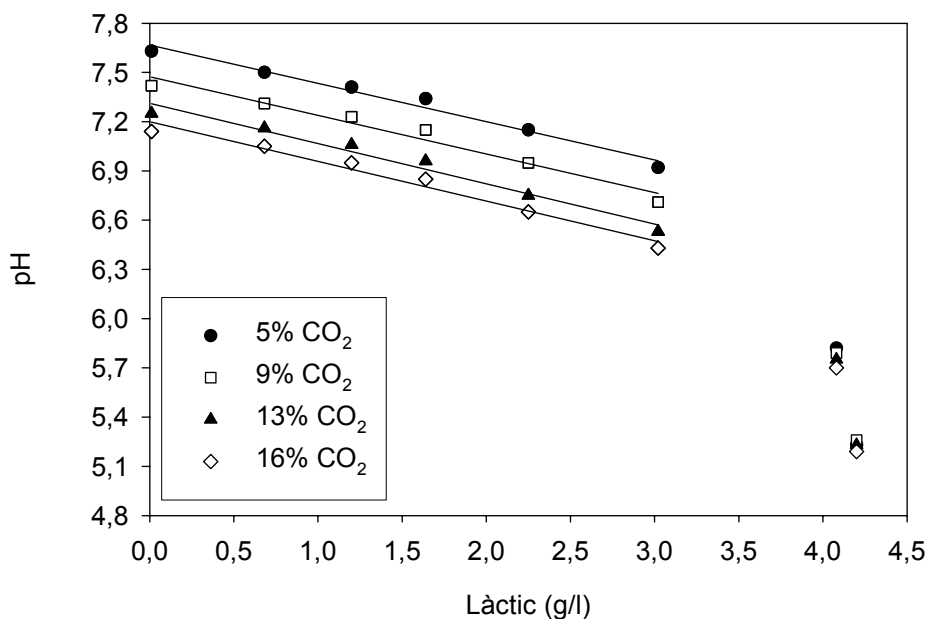


Figura 4-10: Efecte en la variació del pH segons la concentració d'àcid làctic i el percentatge de  $\text{CO}_2$  en l'atmosfera controlada de l'incubador, en el medi MEM-G.

D'aquesta manera, es planteja la hipòtesi de mantenir el nivell de la concentració de  $p\text{CO}_2$ , si es coneix la porció de la variació del pH generada per la dissolució del  $\text{CO}_2$  al medi. El que es pretén és emular l'evolució de la  $p\text{CO}_2$  dels sistemes de cultiu en flascons, a partir

de determinar el pH del medi. Per a mesurar l'efecte sobre el pH del nivell de diòxid de carboni dissolt, s'exploren dues possibles metodologies descrites a la Figura 4-11.

La primera consisteix en mesurar l'increment de pH al desplaçar el  $\text{CO}_2$  dissolt mitjançant el bombolleig en el medi amb nitrogen gas. El bombolleig del  $\text{N}_2$  provocarà una desabsorció del diòxid de carboni, desplaçant la reacció des de la forma desprotonada del bicarbonat cap a la producció de  $\text{CO}_2$ , sent aquest desabsorbit de nou. Aquest procés comporta la desaparició de protons del medi que es reflecteix en un augment de pH. La diferència entre el pH inicial de la mostra, i el determinat després del bombolleig amb  $\text{N}_2$  es podrà relacionar amb la concentració de  $\text{pCO}_2$ , essent el pH residual de la mostra el relacionat amb la concentració d'àcid làctic de la mateixa.

L'altra opció consisteix en bombollejar  $\text{CO}_2$  a la mostra fins assolir el 100% de saturació de diòxid de carboni dissolt ( $\text{pCO}_2=100\%$ ). Aquest procés desplaça la reacció en sentit invers que en cas anterior, i per tant, hi ha d'haver una acumulació de protons en la mostra que es reflexa en una davallada del pH.

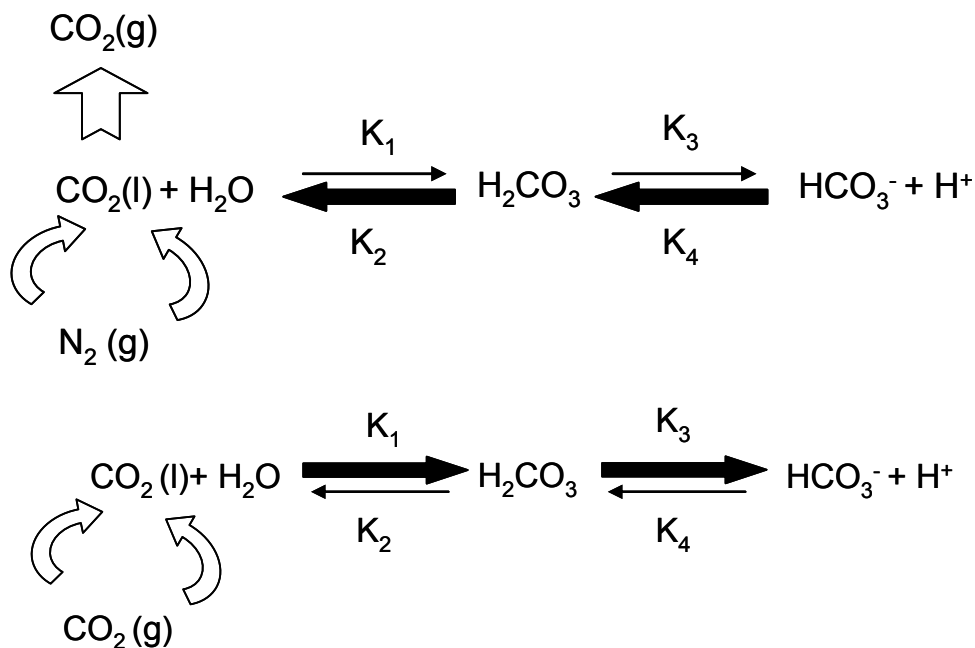


Figura 4-11. Esquemes del desplaçament de les reaccions d'equilibri al provocar un desplaçament del  $\text{pCO}_2$  dissolt mitjançant bombolleig de  $\text{N}_2$  (figura superior) o bé saturant el medi per aportació de  $\text{CO}_2$  (figura inferior).

La quantificació de l'evolució de la variació de pH que experimenta una mostra sintètica (medi MEMG fresc) al ser bombollejada per nitrogen o diòxid de carboni es mostra a la Figura 4-12. L'assaig es realitza en tubs *falcons* de centrífuga de 50 ml (tubs cònics) amb un volum

de medi de 20 ml, i el bombolleig dels gasos es realitza a través d'una pipeta Pasteur que s'ubica al fons de tub, garantint així una homogeneïtzació de la mostra provocada pel mateix flux de bombolles vertical del propi gas. El cabal de gas emprat és de 0,4 l/min. La mesura de pH es realitza cada 10 minuts, havent-se d'aturar en bombolleig per uns segons.

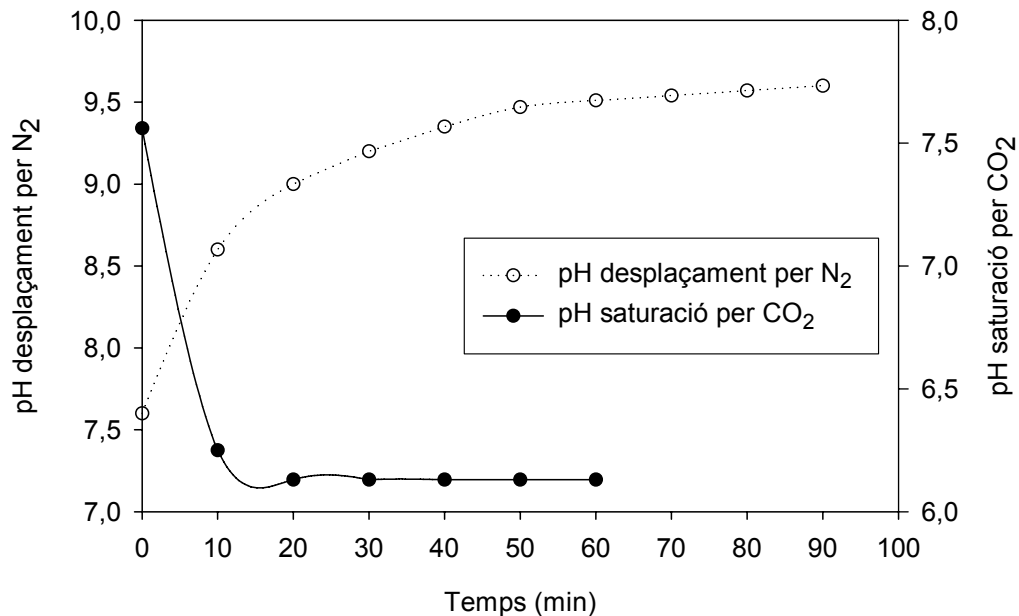


Figura 4-12: Evolució de la variació del pH en una mostra de medi MEMG degut al desplaçament del CO<sub>2</sub> amb N<sub>2</sub>, i a la saturació del tampó bicarbonat degut a l'aportació de CO<sub>2</sub>.

Comparant de forma qualitativa les dues corbes de desplaçament de la reacció d'equilibri bicarbonat-CO<sub>2</sub> (Figura 4-12), s'observa que la cinètica de desplaçament per N<sub>2</sub> és més lenta que no pas la cinètica per saturació de la pCO<sub>2</sub>, obtenint-se una corba amb un perfil més suau, i l'estabilització del perfil (és a dir el total desplaçament del CO<sub>2</sub>) és progressiu. En canvi, el perfil de la variació del pH obtingut per saturació de la pCO<sub>2</sub> mostra una primera fase entre el moment inicial, i aproximadament els 15 minuts, una forta davallada i posteriorment, el valor del pH roman constant indicant l'assoliment del 100% de saturació de la pCO<sub>2</sub>. La valoració dels resultats apunta a emprar la segona metodologia per ser més ràpida i requerir menys quantitat de gas a bombollejar.

Una vegada triada la metodologia per a la quantificació de la variació de pH pel desplaçament del equilibri bicarbonat-CO<sub>2</sub>, és necessari comprovar que realment l'efecte sobre el pH de cadascuna de les espècies és independent (CO<sub>2</sub> i àcid làctic). L'experiment consisteix en preparar diferents mostres sintètiques de medi MEMG fresc amb diferents concentracions d'àcid làctic (des de 0 fins a 4 g/L), i mantenir-les en incubadors de CO<sub>2</sub> consignats a 5, 9, 13 i 16 % de CO<sub>2</sub> durant 12 hores. També es prepara una sèrie que no es

realitzarà en incubador, sinó que se li bombollejarà  $N_2$  per desplaçar el  $CO_2$  dissolt. Posteriorment i de forma immediata, es mesura el pH que ha assolit cadascuna de les solucions, i a continuació es procedeix a la saturació de la  $pCO_2$  de les mostres, bombollejant  $CO_2$  durant 20 minuts i mesurant el pH final. Els resultats es mostren a la Figura 4-13.

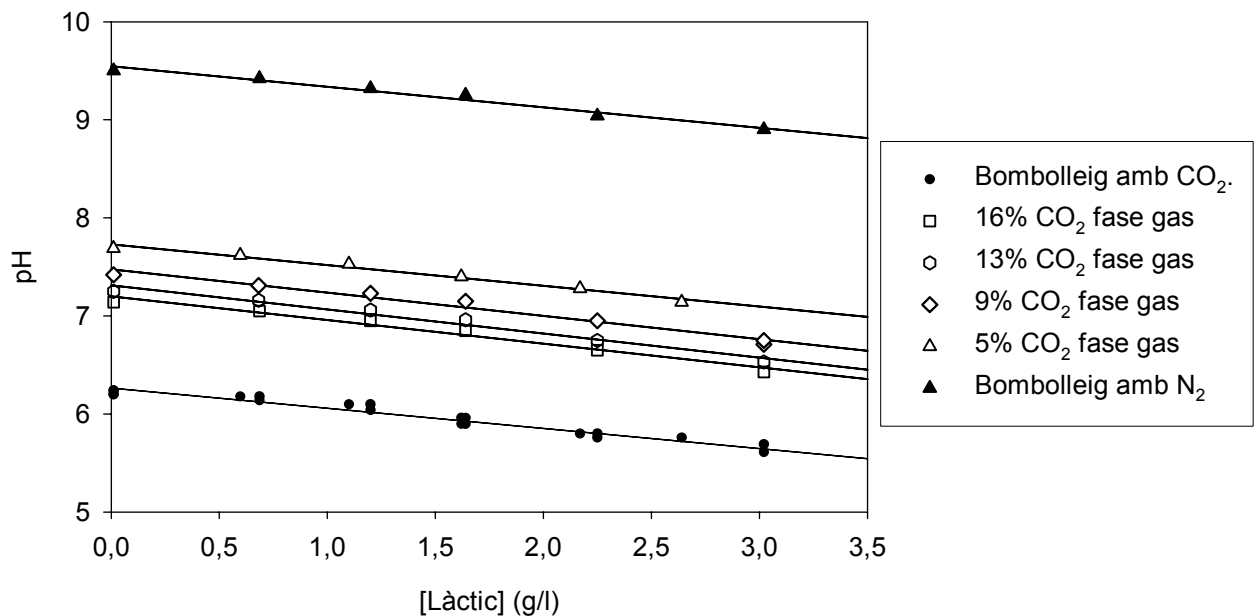


Figura 4-13: Variació del pH en medi MEMG en funció de la concentració d'àcid làctic i del percentatge de  $CO_2$  en la fase gas. Com a valors de referència s'utilitza el bombolleig directe amb  $CO_2$  i amb  $N_2$ .

Els resultats mostren i confirmen la independència sobre l'efecte del pH de cada una de les espècies presents en el medi sintètic. Per cada subgrup de mostres que tenen la mateixa concentració d'àcid làctic, el pH mesurat augmenta a mesura que disminueix la concentració de  $pCO_2$ , i al realitzar la saturació per bombolleig de  $CO_2$ , totes les mostres amb la mateixa concentració de làctic evolucionen i s'estabilitzen en el mateix valor de pH.

Per altra banda, s'observa que els perfils lineals dels subgrups de mostres amb la mateixa concentració de  $pCO_2$  (que estan en equilibri amb la concentració de la fase gas de  $CO_2$  de 0, 5, 9, 13, 16 i 100%), tenen pendents aproximadament entre els valors de -0,21 i -0,24 (unitats de pH / àcid làctic (g/L)), configurant una sèrie de rectes paral·leles. Aquesta relació mostra la possibilitat d'establir una metodologia de quantificació de la concentració de  $CO_2$  en la fase gas en equilibri amb la  $pCO_2$ , sense necessitat de conèixer la concentració de àcid làctic de la mostra, únicament mesurant la reducció del pH en el procés de saturació de la  $pCO_2$ . Així doncs, a partir de les ordenades a l'origen de les diferents rectes, es pot calcular l'increment de pH respecte l'ordenada a l'origen de la recta de 100% de saturació de  $pCO_2$ . La Figura 4-14 mostra la representació del % de  $CO_2$  de la fase gas d'una mostra, en front de la

reducció del pH que ha patit la mateixa mostra al assolir la saturació per bombolleig de CO<sub>2</sub>, observant-se que aquesta relació dins del rang de treball (al voltant de 13% de CO<sub>2</sub>) és lineal.

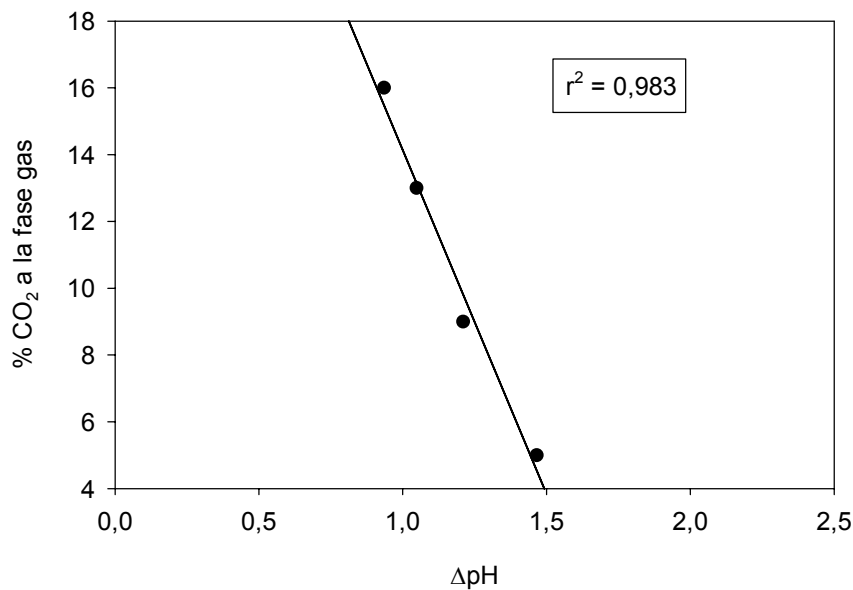


Figura 4-14: Relació entre l'increment de pH i la concentració de CO<sub>2</sub> de la fase gas en les mostres de medi MEM-G.

Finalment s'estableix la correlació pel medi MEMG que mostra la següent equació que relaciona la concentració de CO<sub>2</sub> en la fase gas d'una mostra amb la reducció del valor del pH que experimenta per saturació pCO<sub>2</sub> mitjançant bombolleig de CO<sub>2</sub> gas.

$$\%CO_2 = 34,74 - 20,60 \cdot \Delta pH \quad \text{Equació 4-1}$$

Emprant aquesta metodologia senzilla, és possible realitzar un seguiment fora de línia per a mantenir el valor de la pCO<sub>2</sub> constant en els cultius en bioreactor, si bé no es mesura el valor concret de la pCO<sub>2</sub>, ja que aquesta dependria no tan sols del sistema de cultiu utilitzat, sinó també, de l'equilibri entre les dues fases i de l'equilibri entre les diferents espècies químiques que conformen el tampó de pH en el medi de cultiu, essent una mesura relativa i sistema-dependent. A més, com que l'objectiu és aconseguir una pCO<sub>2</sub> constant que iguali la que hi havia en els sistemes de cultiu que entren l'incubador, aquesta es pot establir a partir de la diferència de pH que experimenta una mostra al enriquir-la amb CO<sub>2</sub>, sense necessitat de conèixer el valor concret de la pCO<sub>2</sub>. En definitiva, d'una manera molt senzilla, tot i que indirecte, es poden emprar les mesures de concentració d'àcid làctic i de pH per a estimar els nivells relatius de pCO<sub>2</sub> al sistema de cultiu en equilibri amb la fase gas, o per a estimar l'efecte de la variació del percentatge de CO<sub>2</sub> en el medi de cultiu.



## **4.5. Cultius en bioreactor de 2 litres.**

Una vegada posada a punt la metodologia per a poder mantenir la  $p\text{CO}_2$  desitjada al medi de cultiu, es plantegen finalment els experiments en bioreactor. Els aspectes addicionals a tenir en compte en aquest sistema de cultiu són bàsicament l'agitació i l'aeració, que poden afectar al procés d'ancorament de les cèl·lules als microsuports. L'agitació es fixa a 40 rpm, que és la velocitat mínima observada necessària per a mantenir els microsuports en suspensió. Addicionalment, es dissenya una estratègia homòloga a l'emprada en els cultius en flascó agitad, en la que es provoquen tres aturades de cinc minuts espaiades en períodes de 30 minuts, per a afavorir el contacte entre el microsuport i les cèl·lules. Pel que fa a l'aeració, es proposa iniciar el cultiu en un medi saturat, i no aerar-lo en l'etapa de creixement, donat que (tenint en compte els nivells cel·lulars que s'espera assolir), l'oxigen no ha d'esdevenir limitant. No obstant, sí que es planteja aerar el cultiu una vegada es procedeixi en la infecció del mateix. El cabal d'aeració emprat és de  $3,33 \cdot 10^{-3}$  vvm (0,2 l/h), sent una aeració contínua, mantenint sempre la relació de mescla de gasos.

Per altra banda, s'ha d'establir la metodologia per a mantenir el cultiu amb una  $p\text{CO}_2$  equivalent a la que hi havia en els incubadors consignats al 13% de  $\text{CO}_2$  ( d'aquí en endavant  $\text{CO}_{2[\text{eq}]}$ ), necessària per una eficiència en el procés infectiu i replicatiu del virus. Emprant les relacions (pH-concentració d'àcid làctic-%  $\text{CO}_2$ ) descrites a la Figura 4-13, es determina per un medi MEMG, sense presència de cèl·lules, el valor de pH = 7,21 per a disposar d'una  $\text{CO}_{2[\text{eq}]}$  al 13% de  $\text{CO}_2$  en la fase gas, que s'ajusta a l'inici de la fermentació prèviament a la inoculació de cultiu. En les condicions d'operació descrites anteriorment, s'ajusta la mescla de gasos necessària per a assolir el pH de 7,21, que s'obté fixant un 20% d'obertura de la vàlvula del corrent de  $\text{CO}_2$ . Aquesta operació, ajustar el valor d'obertura de la vàlvula del corrent de  $\text{CO}_2$ , s'haurà de realitzar per cadascun dels muntatges amb que es treballi, fins assolir l'increment de pH desitjat a l'inici del cultiu, que al seu temps indica que es treballa en el valor de  $p\text{CO}_2$  desitjat. Cal operar d'aquesta manera degut a la naturalesa indirecta de la metodologia que s'ha posat a punt.

Finalment, el recanvi de medi s'efectua al quart dia després de la inoculació, i només es necessari uns 10 minuts d'aturada de l'agitació per a la precipitació de la totalitat de les partícules de microsuports. A través d'una cànula situada a uns 5 cm del fons del reactor, s'efectua l'extracció del medi esgotat i s'introdueix el nou medi (sense sèrum) i l'inòcul víric.

### 4.5.1. Cultiu en bioreactor amb una V/S=0,12.

Finalment doncs, tenint en compte totes les consideracions anteriors, es planteja la realització d'una sèrie d'experiments en bioreactor amb una relació de V/S = 0,12 (3 g/L de Cytodex 3), una agitació de 40 rpm, ajustant el pH inicial a un valor de 7,21 i deixant-lo evolucionar lliurement. Es realitza dos experiments en aquestes condicions, treballant amb dos valors diferents de MOI:  $2,5 \cdot 10^3$  i 5 partícules infectives/cèl·lula.

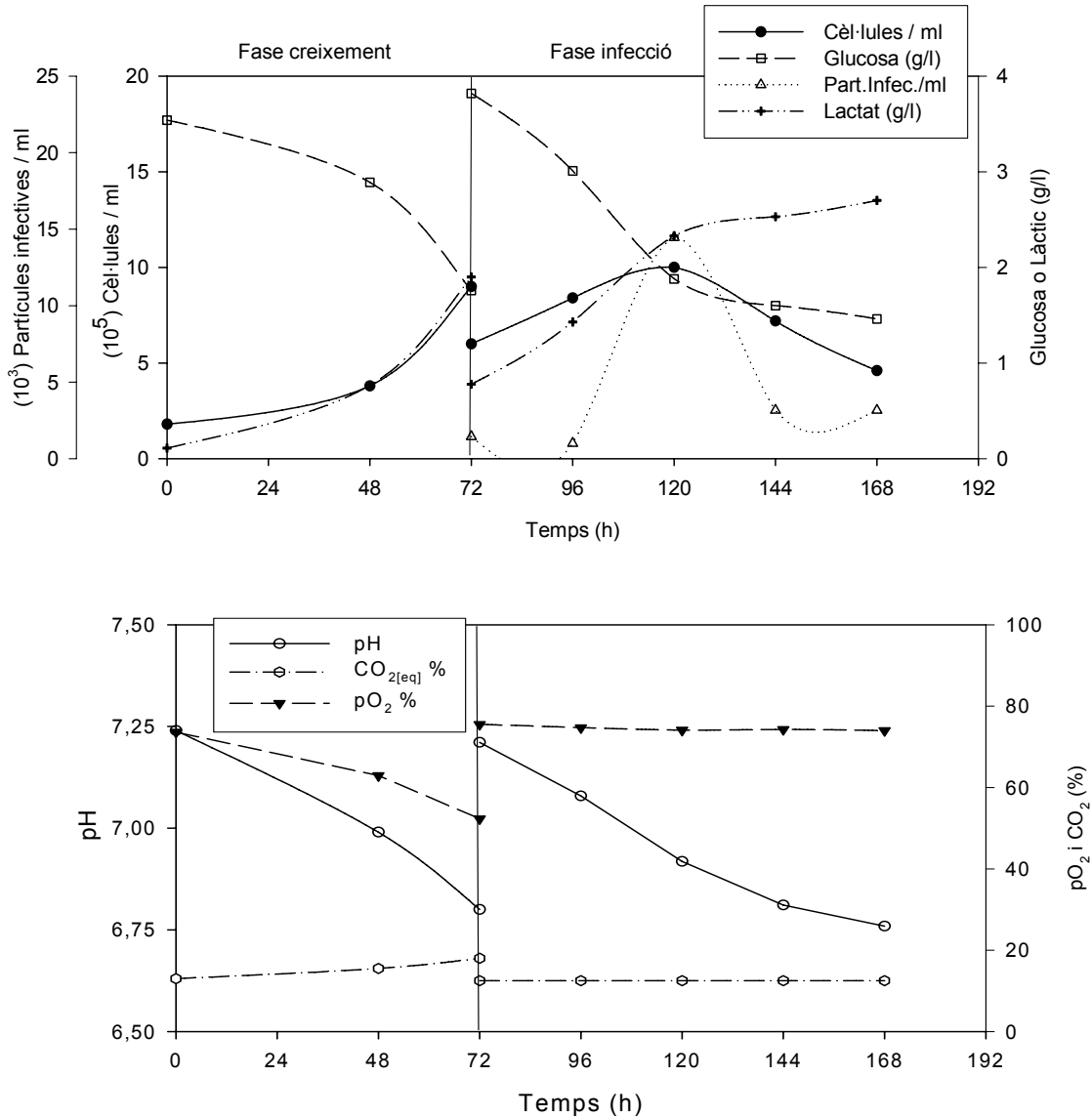


Figura 4-15: Evolució del cultiu en reactor de 2 litres de volum, amb 3 g/L de Cytodex 3 (V/S = 0,12), una  $pCO_2$  en l'etapa d'infecció equivalent a la que hi havia en un incubador al 13% de  $CO_2$  i una MOI =  $2,5 \cdot 10^3$  partícules infectives per cèl·lula. Part superior: Evolució de la Glucosa, làctic, concentració cel·lular i producció de partícules infectives. Part inferior: Evolució del pH, del  $pO_2$  i del  $CO_{2[eq]}$

A les Figura 4-15 i Figura 4-16 es presenten els resultats experimentals on es diferencia una primera fase de creixement sense aeració, seguida de la fase d'infecció, que

s'inicia en el moment que s'assoleix una concentració cel·lular de  $10^6$  cèl·lules/mL (similar a la concentració d'infecció en els flascons), amb el corresponent recanvi de medi sense sèrum, i amb una aeració amb un 20% d'obertura de la vàlvula del corrent de  $\text{CO}_2$ .

En el primer experiment la MOI és baixa, del mateix ordre que les MOIs que s'han utilitzat en els cultius estàtics i agitats dels apartats anteriors, i es vol comprovar si es manté l'eficiència d'infecció (similar índex de replicació), per posteriorment repetir l'experiment a una MOI més elevada, amb la intenció d'assolir una concentració vírica major i una millor eficàcia del procés.

Al llarg dels cultius la concentració de  $\text{CO}_{2[\text{eq}]}$  ha evolucionat al voltant del 13%, amb una lleugera acumulació en la fase de creixement cel·lular, però no superant-se mai el 18% de  $\text{CO}_{2[\text{eq}]}$  (com es pot observar en la part inferior de la figura). Per altra banda, el  $\text{pO}_2$  durant la fase inicial ha anat disminuint (es partia de valors propers al 100%, i és un sistema que inicialment no té aeració), arribant a uns valors mínims superiors al 20%, valor que no representa cap limitació pels cultius. Posteriorment en la fase d'infecció, el valor de  $\text{pO}_2$  s'ha mantingut entre el 60% i el 80% en tots els casos. Es pot afirmar que l'estratègia ideada per a la aeració, i el manteniment dels valors de  $\text{pCO}_2$  i  $\text{pO}_2$  han estat correctes, no suposant cap limitació pel bon desenvolupament del cultiu.

Pel que fa al seguiment de l'evolució de la concentració de glucosa i de lactat, no s'observa limitació de glucosa en cap dels experiments, ja que aquesta sempre es manté a una concentració superior a 1 g/L al llarg de tots els cultius, i degut a les característiques del medi de cultiu comercial balancejat, s'ha de suposar que tampoc hi ha limitació de cap altre nutrient. Respecte a l'àcid làctic acumulat, inferior a 2,7 g/L en el seu màxim, no comporta limitacions tòxiques pel cultiu, i al estar dins del rang pel qual s'ha desenvolupat la metodologia de seguiment de  $\text{pCO}_2$  (rang 0 i 3 g/L), no suposa una cap alteració en aquest sentit.

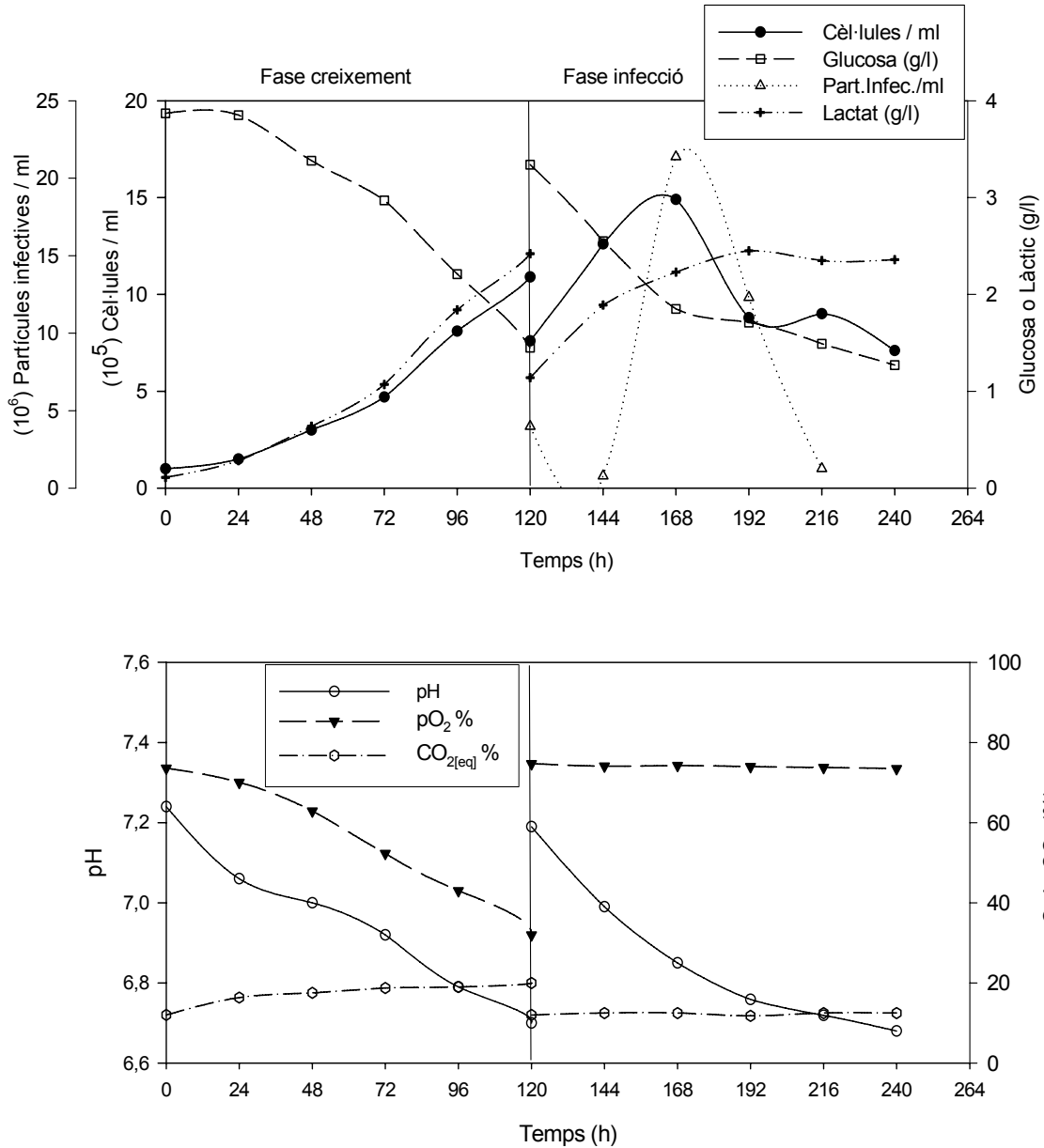


Figura 4-16: Evolució del cultiu en reactor de 2 litres de volum, amb 3 g/L de Cytodex 3 (V/S = 0,12), una pCO<sub>2</sub> en l'etapa d'infecció equivalent a la que hi havia en un incubador al 13% de CO<sub>2</sub> i una MOI = 5 partícules infectives per cèl·lula. Part superior: Evolució de la glucosa, àcid làctic, concentració cel·lular i producció de partícules infectives. Part inferior: Evolució del pH, del pO<sub>2</sub> i del CO<sub>2[eq]</sub>

Les diferències principals entre els dos experiments són el moment d'infecció i la multiplicitat d'infecció (MOI). El moment d'infecció és diferent degut a diferències que hi ha hagut amb l'inòcul cel·lular, però es manté el criteri de realitzar la infecció al assolir una concentració cel·lular de  $10^6$  cèl·lules/mL. S'observa a la Figura 4-15 que la infecció es realitza al tercer dia de la inoculació del cultiu, amb una concentració de concentració cel·lular disponible de  $9 \cdot 10^5$  cèl·lules /mL (que després del recanvi de medi resta en  $6 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL), i la MOI emprada és considerablement baixa ( $2,4 \cdot 10^{-3}$  partícules infectives/cèl·lula). En

aquestes condicions d'operació, s'assoleix un augment de la concentració viral d'un exponent, assolint-se una concentració vírica de  $1,45 \cdot 10^4$  partícules infectives /mL.

En segon cas, la infecció del cultiu es realitza al cinquè dia després de la inoculació, disposant-se d'una concentració cel·lular de  $10,9 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL (que disminueix fins  $7,6 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL després del recanvi de medi), i la MOI és de 5 partícules infectives/cèl·lula, considerant-se aquest valor com una multiplicitat infectiva de rang alt. Sota aquestes condicions s'assoleix un increment de concentració vírica de  $3,98 \cdot 10^6$  partícules infectives/mL fins a  $2,14 \cdot 10^7$ , implicant un augment que no arriba a 10 vegades la concentració d'infecció. En canvi, si es considera l'índex de replicació (virus finals/cèl·lula infectada), s'obté un valor de 28 virus/cèl·lula, valor del mateix ordre que el cultiu de referència inicial del capítol, obtingut en ampolles rodants.

## **4.6. Anàlisi del bioprocés IBDV-Cèl·lules Vero.**

### **Possibles alternatives.**

El bioprocés que s'ha estudiat en aquest apartat ha mostrat que, el punt clau es centra en la interacció entre els dos organismes, cèl·lules *Vero* i IBDV. Els diferents experiments realitzats mostren que l'etapa crítica per a desenvolupar el procés consisteix en la infecció del cultiu. De fet, amb els diferents sistemes provats, el creixement cel·lular s'ha desenvolupat sense observar-se cap problemàtica, sent reproducible.

Tots els resultats que s'han obtingut dels experiments al llarg del capítol es resumeixen a la Taula 4-2, on bàsicament, es recullen les condicions i els paràmetres a l'inici i al final de la fase d'infecció del cultiu. Els valor més comparable entre els diferents experiments, degut a la diferència de MOIs que s'ha emprat al llarg del capítol, és l'anomenat índex de replicació, és a dir, el nombre de virus que s'obtenen per cèl·lula infectada. En els casos en que la MOI és inferior a 1, aquest valor coincideix amb el valor de replicació, és a dir la relació entre virus inicials i virus finals, ja que s'assumeix que cada cèl·lula només pot ser infectada per un sol virus.

Sistema de cultiu	Condicions de cultiu		Valors en el moment de la infecció			
			Concentració Cel·lular (10 <sup>5</sup> cèl·l/ml)	Concentració Vírica (10 <sup>3</sup> virus/ml)	MOI	Concentració Cèl·lules infectades (10 <sup>5</sup> cèl·l/ml)
Ampolla rodant			8	1000	1,25	8,00E+00
Flascó	Tancat	V/S = 0,12	12	1,145	0,001	1,15E-02
		V/S = 0,35	2,05	1,995	0,01	2,00E-02
	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	10,4	1,6	0,002	1,60E-02
		V/S = 0,35	8,86	0,676	0,001	6,76E-03
Flascó Agitat	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	7,9	14,7	0,019	1,47E-01
Bioreactor	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	6	1,44	0,002	1,44E-02
			7,6	3980	5,2	7,6

Sistema de cultiu	Condicions de cultiu		Valors al final de la infecció		
			Concentració Vírica (10 <sup>3</sup> virus/ml)	Replicació vírica <sup>1</sup>	Índex de replicació <sup>2</sup>
Ampolla rodant			30000	30,00	37,50
Flascó	Tancat	V/S = 0,12	30,9	26,99	26,99
		V/S = 0,35	10	5,01	5,01
	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	21,38	13,36	13,36
		V/S = 0,35	6,76	10,00	10,00
Flascó Agitat	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	146	9,93	9,93
Bioreactor	CO <sub>2[eq]</sub> = 13%	V/S = 0,12	14,45	10,03	10,03
			21380	5,37	28,13

<sup>1</sup> Replicació vírica: (virus màxim/virus inicials).

<sup>2</sup> Índex de replicació (virus màxim/cèl·lules infectades).

Taula 4-2: Taula resum on es recullen totes les dades dels experiments mostrats al llarg del capítol, on s'exposa les condicions en que s'han realitzat aquests, els valors dels diferents paràmetres en el moment d'infecció i al final del cultiu.

Així doncs, com es pot observar a la taula, l'índex de replicació màxim pertany al cultiu de referència en ampolla rodant, però també s'han assolit valor similars en cultius en flascó (cultius estàtics), i en bioreactor (sistema agitat amb microsuports), amb índexs de replicació propers a 30. També es pot apreciar la poca productivitat i la fragilitat del sistema d'interacció virus-cèl·lula, ja que els valors de l'índex de replicació oscil·len entre 10 i 30 en els diferents casos estudiats (independentment de la MOI emprada). En altres tipologies de virus, s'ha descrit replicacions d'entre 100 i 10000 vegades, comportant concentracions víriques finals de  $4,25 \cdot 10^8$  partícules infectives/mL en el cas dels adenovirus i adenoassociats (Meghrou *i col.* 2005), o per exemple emprant com a vector d'expressió els baculovirus, on s'assoleixen entre 0,3 i  $15 \cdot 10^9$  partícules infectives/mL segons la MOI utilitzada (entre 0,001 i 5) (Elias *i*

col·2000; KT Wong i col·1996). Per tant, sembla deduir-se d'aquesta anàlisi, que el virus IBD emprat no es replica de forma massa efectiva (en comparació a altres virus) infectant cèl·lules *Vero*, que pel contrari si que han estat emprades, obtenint-se bons rendiments, en altres bioprocessos.

De fet, l'ús de la línia de les cèl·lules *Vero* en la producció de IBDV per a la confecció de vacunes, aporta resultats diversos segons diferents autors. Per una banda la línia cel·lular de *Vero* és emprada per a l'atenuació del IBDV, que posteriorment serà emprat per a la conformació de les vacunes, mitjançant passes seriatos d'infecció en cèl·lules *Vero* aconseguint finalment la desaparició dels efectes patogènics al ser administrada a les aus de granja (Rasool i Hussain·2006). Altres autors, han estudiat l'efectivitat de la infecció i replicació vírica de diferents soques de IBDV, en diferents línies cel·lulars com MA-104, cèl·lules *Vero* i BGM-70, determinant productivitats similars que per la línia *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF), cèl·lula receptora natural del IBDV (Jackwood i col·1987). Per altra banda, altres estudis mostren resultats de replicació vírica en cèl·lules *Vero* que oscil·len entre  $2,2 \cdot 10^5$  i  $1 \cdot 10^8$  partícules infectives/mL, segons la soca de IBDV emprada (Kibenge i col·1988).

La modificació de la línia cel·lular de cèl·lules *Vero*, és una altra estratègia proposada per alguns autors per tal de millorar l'eficiència de replicació vírica del IBDV en aquesta línia cel·lular. Un altre estudi, compara la replicació vírica del IBDV en una línia de *Vero* (on s'assoleix un títol víric de  $2 \cdot 10^3$  partícules infectives/mL), amb la mateixa línia transfectada amb el RNA que codifica les proteïnes que configuren la càpside del virus (VP2, VP3 i VP4), aconseguint títols vírics de  $1 \cdot 10^8$  partícules infectives/mL (MA Peters i col·2005). Altres autors, descriuen la no susceptibilitat de la soca de cèl·lules *Vero* per ser infectades per el virus IBD (Simoni i col·1999), no observant-se efectes citopàtics com a conseqüència de la infecció. En canvi aquest mateix treball obté resultats infectius bons emprant *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF) i la línia RK<sub>13</sub>.

Per tant, donada la fragilitat que s'observa en aquest cas pel que fa a la interacció cèl·lula receptora-virus, i malgrat que s'ha arribat a poder definir unes condicions en que el procés és possible, tot i que de baixa productivitat, es considera que cal explorar o bé altres opcions de cèl·lula receptora, o modificar la soca de cèl·lules *Vero*, o finalment, optar per un sistema d'expressió i producció d'una vacuna alternativa que no comporti l'ús del mateix agent causant de la malaltia, és a dir, explorar diferents candidats vacunals que poguessin conformar una vacuna recombinant. El risc, els equips i instal·lacions necessàries per a produir virus, com a agents vacunals, incrementen el cost final de producció, tal i com s'ha explicat anteriorment a la introducció. Així doncs, els capítols que prossegueixen exploren la

possibilitat d'expressió de candidats vacunals recombinants per a la diagnosi i profilaxis de la malaltia de Gumboro.



## **4.7. Bibliografia.**

Altaras, NE; Aunins, JG; Evans, KE; Kamen, AA; Konz, JO i Wolf, JJ. 2005. Production and formulation of adenovirus vectors. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 99:193-260.

Elias, CB; Zeiser, A; Bedard, C i Kamen, AA. 2000. Enhanced growth of *Sf9* cells to a maximum density of  $5.2 \times 10^7$  cells per mL and production of beta-galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 68:381-388.

Frahm, B.; Blank, H. C.; Cornand, P.; Oelssner, W.; Guth, U.; Lane, P.; Munack, A.; Johannsen, K. i Portner, R. 2002. Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of Biotechnology*. 99:133-148.

Ge, X. D.; Kostov, Y. i Rao, G. 2005. Low-cost noninvasive optical CO<sub>2</sub> sensing system for fermentation and cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 89:329-334.

Jackwood, D. H.; Saif, Y. M. i Hughes, J. H. 1987. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian diseases*. 31:370-375.

Kibenge, FSB; Dhillon, AS i Russell, RG 1988. Growth of Serotypes I and II and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Virus in *Vero* Cells. *Avian Diseases*. 32:298-303.

Meghrou, J; Aucoin, MG; Jacob, D; Chanhai, PS; Arcand, N i Kamen, A. 2005. Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a *baculovirus/insect cell* suspension culture system: From shake flasks to 20-L bioreactor. *Biotechnology Progress*. 21:154-160.

Montagnon, BJ. 1989. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for *Vero Cell* line. *Developments in Biological Standardization*. 70:27-47.

Ogawa, H.; Yamaguchi, T.; Setiyono, A.; Ho, T.; Matsuda, H.; Furusawa, S.; Fukushi, H. i Hirai, K. 1998. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Archives of Virology*. 143:2327-2341.

Peters, MA; Lin, TL i Wu, CC. 2005. Infectious bursal disease virus recovery from *Vero* cells transfected with RNA transcripts is enhanced by expression of the structural proteins in trans. *Archives of Virology*. 150:2183-2194.

Rasool, Muhammad Hidayat i Hussain, Iftikhar. 2006. Preparation and evaluation of *Vero*-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. *Vaccine*. 24:2810-2814.

Sanfeliu, Anna. 1995. Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Simoni, IC; Bittencourt, MJ; Marconi, R; Backx, AM; Madeira, N i Weis, C. 1999. Susceptibility of cell lines to avian viruses. *Review Microbiology*. 30:373-376.

Wong, KT; Peter, CH; Greenfield, PF; Reid, S i Nielsen, LK 1996. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant *baculovirus*: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:659-666.

Yasumura, Y i Kawakita, M. 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*. 21:1201–1219.

Zanghi, JA; Schmelzer, AE; Mendoza, TP; Knop, RH i Miller, WM. 2000. Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO<sub>2</sub> or pH. *Biotechnology and Bioengineering*. 65:182 - 191.



**5. OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA**  
**RECOMBINANT VP<sub>2</sub> EN EL SISTEMA**  
***Baculovirus-Sf9.***



## **5.1. Introducció.**

### **5.1.1. *Baculovirus* com a vector d'expressió.**

Els *Baculovirus* tradicionalment van ser utilitzats cap als anys 40 per a controlar plagues d'insectes, degut a la seva alta capacitat infectiva en més d'un centenar d'espècies (Blissard i Rohrmann·1990). Els baculovirus comprenen un gran nombre de patògens vírics d'artròpodes, entre els que destaquen els gèneres *Lepidoptera*, *Diptera*,... i s'han trobat més de 600 espècies d'insectes amb presència de baculovirus.

La utilització de baculovirus com a sistema d'expressió va ser concebuda als anys vuitanta (Smith *i col.*·1983), i amb menys d'una dècada s'ha convertit en un dels sistemes d'expressió eucariòtic més valorat. Les nucleocàpsides produïdes pel baculovirus tenen forma de bastó, d'on deriva el seu nom, el mot *baculo*. Els baculovirus tenen una grandària considerable: 30 x 200 nm pels virions (BV) i els icosàedres arriben a mides de 5 µm, i posseeixen una doble cadena circular de DNA, amb una grandària entre els 80 i els 200 Kpb.

Les proteïnes produïdes amb aquest sistema s'utilitzen en un ampli espectre d'aplicacions en l'àmbit de la salut: per a recerca bàsica, per a desenvolupar kits de diagnòstic, així com recentment per a teràpia gènica, i també en usos veterinaris (Aucoin *i col.*·2006; Meghrou *i col.*·2005).

Recentment, l'interès ha crescut pel seu ús com a vectors d'expressió de gran quantitat de proteïnes heteròlogues mitjançant la infecció de cèl·lules d'insecte, com per exemple la línia cel·lular *Spodoptera frugiperda 9 (Sf9)*, que es descriu més endavant. Les característiques principals dels baculovirus són, entre d'altres, que permeten expressar proteïnes amb modificacions postransduccionals com glicosilacions i fosforilacions, i com la majoria dels models eucariotes, ofereixen un bon plegament de les proteïnes que expressen. Com en el cas del capítol anterior, es tracta d'un sistema de producció on hi intervenen dos organismes, el propi baculovirus i la cèl·lula receptora del virus, en aquest cas cèl·lules d'insecte, *Sf9*, amb la complexitat que aquesta interacció pot comportar, ja que d'entrada sempre caldrà una fase de creixement cel·lular i una posterior d'infecció.

La família *Baculoviridae* (Francki i col.1991) és dividida en tres subfamílies: *Eubaculovirinae* que comprèn el gènere virus amb polihedrosi nuclear (NPV), virus granulítics (GV) i la subfamília *Nudibaculovirinae* amb un sol gènere (Non-occluded baculovirus) dels baculovirus sense envolta.

Hi ha dues formes dels virus de la polihedrosi nuclear, els virus oclusionats (OV o ODV) i una forma extracel·lular del virus en formació (Budded Virus, BV) (Granados i Williams 1986), que es mostren en la Figura 5-1. Els insectes normalment adquireixen la malaltia per consum d'aliments contaminats amb la forma oclusionada del virus. La matriu que forma la càpsida que oclusiona la forma del virus ODV, està constituïda per una proteïna anomenada polihedrina, amb una mida aproximada de 30kDa (Vlak i col.1990), i té dues funcions bàsiques en la transmissió horitzontal de la malaltia:

- Protegir els virions (BV) de la inactivació durant l'interval de transmissió entre organismes receptors.
- Facilitar l'alliberament dels virions durant la primera fase de la infecció, per dissolució de la matriu polihedríca en l'ambient bàsic (pH=10.5) de l'intestí mitjà de l'insecte.

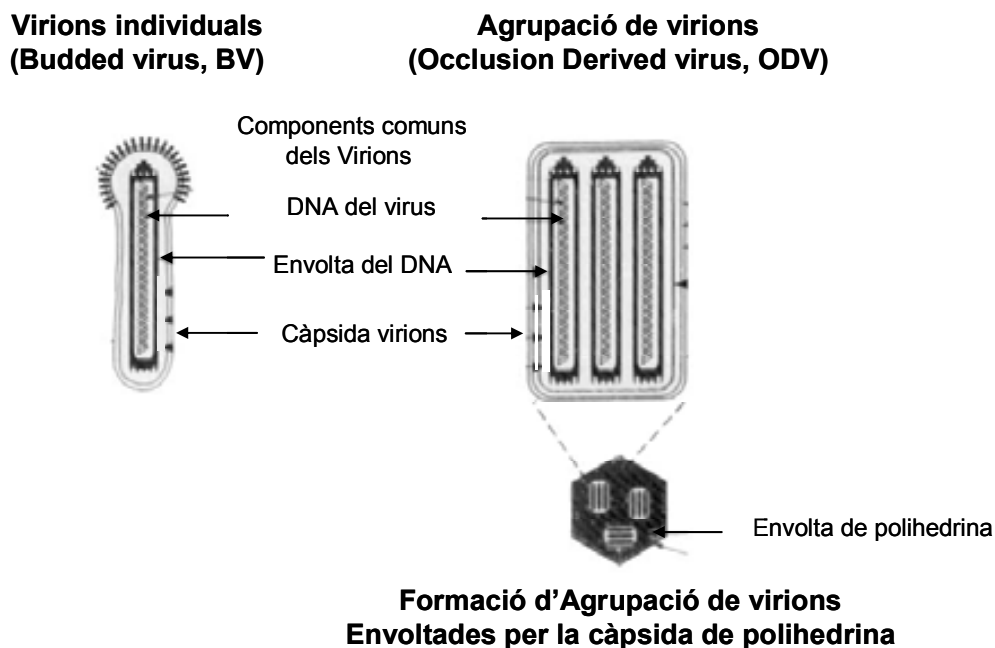


Figura 5-1: Estructura dels baculovirus individuals (virus en formació) (Budded Virus, BV), i dels baculovirus agrupats i envoltats en compartiments, que juntament amb altres conjunts es troben envoltats per una càpsida de polihedrina (Occlusion Derived Virus, ODV).

L'ús dels baculovirus recombinants com a sistema d'expressió, està basat en la substitució del gen de la polihedrina pel gen de la proteïna forània d'interès (DW Miller *i col.* 1986). Aquesta proteïna, degut bàsicament a l'origen de la seva funció, conformar l'envolta dels virions, està precedida per un promotor fort i els seus nivells d'expressió poden arribar entre el 25-50% del total de les proteïnes cel·lulars. Aquests elevats nivells d'expressió es poden observar en la imatge de la Figura 5-2, on es mostra el cicle infectiu (part esquerra) i una cèl·lula d'insecte infectada per baculovirus (sense la substitució del gen de la polihedrina, que disposa d'un promotor fort). La substitució del gen de la polihedrina interfereix en la formació de virus oclusionats (per la impossibilitat de sintetitzar la polihedrina que forma el cos d'oclusió), però no s'ha observat cap efecte sobre la producció de virions individuals (BV) (Smith *i col.* 1983). Aquest sistema d'expressió va ser dissenyat per esdevenir un sistema segur de producció, ja que es pot aplicar en cultius *in vitro*, però no disposa de la capacitat de conservar-se fora de condicions controlades de laboratori al perdre la capacitat de formar l'envolta protectora dels virions, i per tant no es pot transmetre entre els insectes en el seu entorn natural.

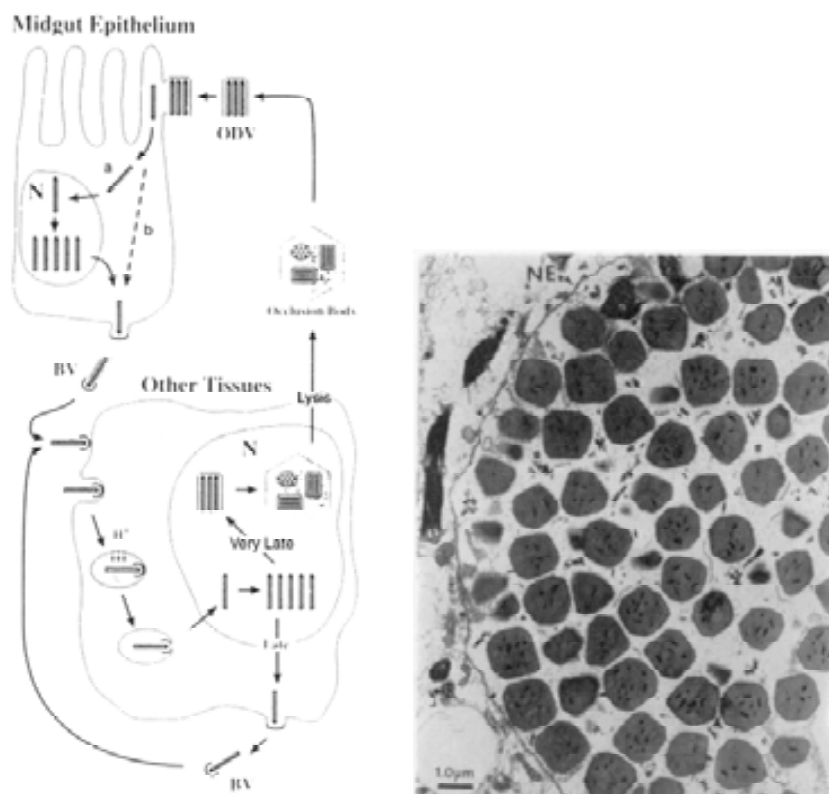


Figura 5-2: Procés d'infecció de baculovirus en cèl·lules d'insecte. Esquerra: A la part superior es mostra la infecció d'una cèl·lula epitelial d'insecte per uns virions oclusionats (ODV) dins la càpsida de polihedrina, mitjançant la fusió amb la membrana plasmàtica. A la part inferior la infecció té lloc a través d'un virió individual (BV) que circula per l'interior de l'organisme. A la dreta s'observa una fotografia d'una cèl·lula infectada, on es poden distingir estructures de polihedrina amb virions a l'interior (ODV).



Una vegada el baculovirus s'ha introduït a la cèl·lula, igual que la resta de virus, aquest utilitza la maquinària cel·lular per a multiplicar-se. Això impedeix que la cèl·lula pugui continuar amb el seu cicle natural, però no es morirà fins que el propi virus la lisi un cop s'hagi completat el cicle d'infecció. El cicle d'infecció està compost de dues etapes, la primera on l'objectiu és obtenir el màxim de replicació de virions, i la segona que està encarada a produir la polihedrina que formarà l'envolta dels virions.

### **Construcció del baculovirus recombinant.**

L'expressió d'una proteïna recombinant necessita dels constructes idonis per a poder ser clonada en els organismes que posteriorment seran utilitzats per a la producció de la proteïna que ha de conformar la vacuna recombinant. En aquest treball, com ja s'ha comentat amb més detall a la introducció general, la proteïna d'interès és la VP2, una de les proteïnes de la càpsida del virus IBD, que es coneix que genera una resposta immunològica més elevada que la resta de proteïnes que conformen la càpsida. La Figura 5-3 mostra l'esquema dels passos a seguir per a realitzar la construcció d'un baculovirus recombinant.

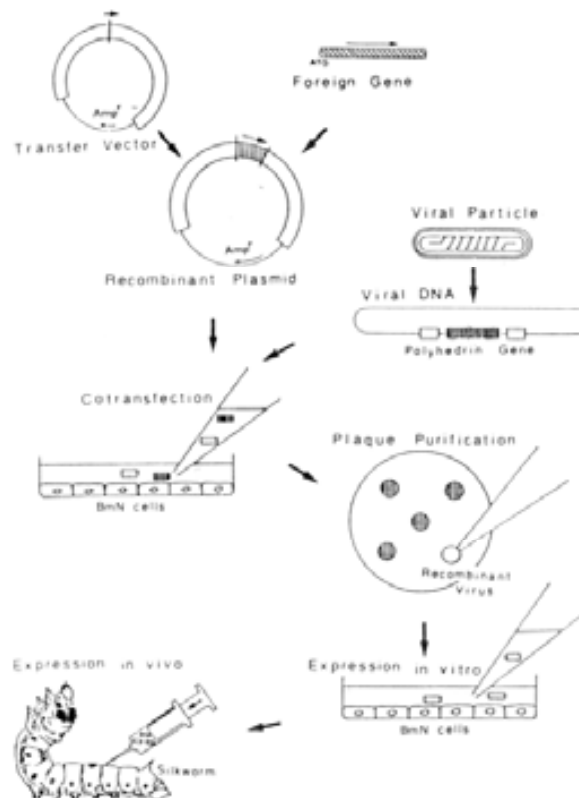
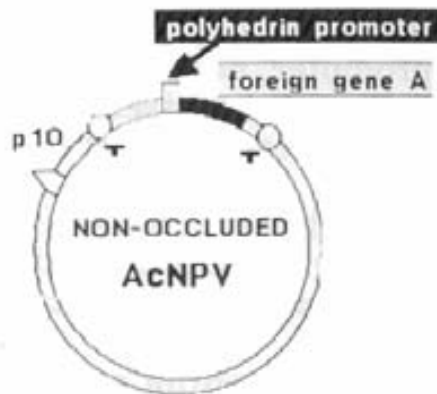


Figura 5-3: Esquema del procés de construcció d'un baculovirus recombinant per a expressar una proteïna heteròloga d'interès. S'insereix el gen que codifica la proteïna d'interès en un plasmidi per baculovirus, i es realitza una cotransfecció del material genètic junt amb el DNA víric a un cultiu de cèl·lules BmN, i posteriorment es selecciona les partícules víriques transfectades i s'expandeixen en nous cultius.

En primer lloc s'ha de generar suficient material genètic que codifiqui per la proteïna d'interès, que s'ha amplificat a partir del RNA missatger emprant tècniques de RT-PCR, obtenint-se un cDNA de la regió que codifica per la VP2 (proteïna amb millor resposta immunològica, tal com s'ha explicat a la introducció). Una vegada s'ha amplificat el material genètic s'introdueix al vector pAcYM1 de transferència per baculovirus (Figura 5-4), clonant-se sota el domini del promotor de la polihedrina, promotor d'expressió fort.



---

Figura 5-4 Esquema del vector de transferència per baculovirus pAcYM1, que ha estat usat per a la construcció del baculovirus recombinant AcVP2.IBDV

---

Per una altra banda s'extreu el material genètic de partícules víriques procedents de la línia de baculovirus que es vol construir. Per a realitzar el constructe del baculovirus s'utilitza la tècnica de la cotransfecció, en la que s'addiciona el plasmidi construït i el material genètic aïllat del baculovirus en un cultiu en monocapa de cèl·lules BmN. Degut a les seqüències homòlogues del plasmidi i del material genètic víric, mitjançant el procés de recombinació homòloga, es generen els baculovirus recombinants.

Una vegada s'ha obtingut el baculovirus recombinant, cal fer la selecció dels millors clons que s'hagin obtingut, i es comprova la seva expressió. Tant les tasques de construcció, selecció, com la seva amplificació i conformació de l'estoc de treball del baculovirus, així com l'obtenció dels anticossos monoclonals per a la identificació i quantificació de la VP2 han estat realitzats per l'empresa INGENASA (Madrid) (Martínez-Torrecedrera *i col.* 2000), i s'han pogut emprar en aquest treball a partir d'una col·laboració conjunta.

### 5.1.2. La cèl·lula receptora, *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9).

Fa quatre dècades es va obtenir la primera línia cel·lular d'insecte en cultiu (Grace 1962) fent créixer cèl·lules *in vitro* d'ovari d'arnes de l'espècie *Antherea eucalypti*. Des del primer estudi amb quatre línies cel·lulars elaborat per Grace, s'han obtingut més de 400 línies cel·lulars procedents de més de 100 espècies d'insectes diferents (Hink i Bezanson·1985; Hink i Hall·1989).

L'ús de cultius de cèl·lules d'insecte com a cèl·lules receptores pel sistema d'expressió de baculovirus ha anat en augment en els últims anys, fet que es reflexa, per exemple, en la producció d'un ampli ventall de medis de cultiu específics. Fa una vintena d'anys només hi havia un parell d'empreses que produïen medis de cultiu per a cèl·lules d'insecte i els seus respectius complements, mentre que actualment gairebé totes les companyies del sector en produeixen (Ranade·2001).

La línia cel·lular escollida en el present treball és la Sf9 (*Spodoptera frugiperda* 9) que ha estat cedida per l'empresa Laboratorios Hipra S.A. (Amer, Girona), també en una col·laboració en un projecte pel desenvolupament del candidat vacunal VP2 amb el sistema d'expressió en baculovirus i cèl·lules d'insecte.

La principal característica a destacar d'aquesta línia cel·lular és la capacitat de ser cultivada tant en suspensió, com adherida a la superfície, tot i que la feble adherència que presenta, així com la major dificultat d'operació del cultiu desaconsellen realitzar els cultius sobre suports, escollint-se l'opció de creixement en suspensió en bioreactors.

Les cèl·lules de Sf9 (Figura 5-5), tenen una grandària que oscil·la entre els 5 i els 20 µm de diàmetre mitjà, considerablement majors que altres eucariotes com els llevats (3-7 µm) i que els organismes procariotes (0.3-1 µm). Les característiques de cultiu principals són: una temperatura òptima de creixement de 27-28 °C, pH entre 6 i 6,5 , i uns valors d'agitació entre 40 i 150 rpm.



---

Figura 5-5: Imatge de microscòpia òptica de *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), cèl·lula receptora a infectar pel vector d'expressió de baculovirus.

---

## **5.2. Medis de cultiu.**

Els medis per a cultius de cèl·lules d'insectes inclouen fonts de carboni (normalment glucosa), una mescla equilibrada de sals minerals que permeten mantenir un pH i una pressió osmòtica adients, i un gran nombre d'aminoàcids i vitamines que la cèl·lula no està capacitada per a produir, com a mínim en quantitats suficients. Els aminoàcids també representen una font de nitrogen, carboni i energia. A més, usualment cal suplementar el medi amb un 1-20% (v/v) de sèrum animal, normalment sèrum fetal de vedella (FCS) o sèrum fetal boví (FBS). Aquest producte proporciona una sèrie d'elements traça, lípids, factors de creixement i hormones que són imprescindibles per a garantir el creixement de molts tipus de cèl·lules animals. D'altra banda, el sèrum també pot contenir una sèrie de compostos que poden no tenir cap efecte positiu, o que, fins i tot, poden arribar a inhibir el creixement de les cèl·lules. Per aquest motiu és necessari provar que cada lot diferent de sèrum emprat permeti el correcte creixement del cultiu cel·lular (Freshney·1989).

### **5.2.1. Medis de cultiu comercials.**

La bibliografia consultada mostra la possibilitat d'obtenir concentracions cel·lulars en cultius de línies de *Sf9* en bioreactors de fins  $5 \cdot 10^6$  (cèl·lules./mL) emprant medis de cultius de composició tant definida com indefinida i en una estratègia de cultiu en discontinu (Klöpinger *i col.*·1990; Maiorella *i col.*·1988; Ogonah *i col.*·1991; J Zhang *i col.*·1992).

D'entre els medis comercials amb formulacions conegudes o semiconegudes, s'ha fet la selecció que es presenta a la Taula 5-1 en funció del seu preu (s'ha de tenir en compte que aquest acaba tenint una repercussió important en el cost final del producte) i les referències sobre la capacitat de suportar el creixement de les cèl·lules Sf9.

Components		Grace suplementat.	Grace	IPL-41	TC-100
Sals	Principals	6	6	6	6
	Traces	0	0	5	0
Fonts de Carboni		7	7	7	1
Aminoàcids		21	21	21	20
Vitamines		11	11	11	10
Suplements	Lactalbúmina		--	--	Triptona
	Extracte de llevat				

Taula 5-1: Recull dels diferents medis disponibles en el mercat amb composicions conegudes o semidefinides. La taula recull informació sobre el nombre de components que els componen agrupats segons la seva naturalesa.

La taula mostra dues possibles alternatives de medis raonablement econòmics, TC-100 i IPL-41 (amb un preu per litre d'uns 8 euros), i el medi Grace (sense i amb suplements, amb preus entre 30 i 50 euros/L). Tots aquests medis estan específicament descrits per a cèl·lules d'insecte, així que tots esdevenen *a priori* una bona opció. No obstant, tant IPL-41 com Grace suplementat han estat originalment desenvolupats per a cultius d'una extensa varietat de lepidòpters, obtenint-se molt bons resultats en el cultiu de *Spodoptera frugiperda* amb infecció per *baculovirus* (Mitsunashi-1982).

Segons es pot observar, els tres medis disposen del mateix nombre de sals principals, però el medi IPL-41 a més conté 5 tipus de sals en concentració traça que poden actuar com a micronutrients, tal com s'indica a la Taula 5-1 o a les composicions detallades dels medis recollits al capítol de Materials i Mètodes. En referència a les fonts de carboni, s'observa una diferència notable entre els medis Grace i IPL-41 que disposen de 7 components diferents que poden actuar com a font de carboni, i el TC-100 que només utilitza una única font. La presència de tantes fonts de carboni pot suposar un problema a l'hora de dissenyar el sistema de monitoratge i control del cultiu, ja que la concentració de la font de carboni pot resultar una variable important a ser mesurada (Casablanca:2001; Finn *i col.*:2006; Tsao *i col.*:2005; Xu *i col.*:2004).

Pel que fa a la presència tant d'aminoàcids com de vitamines, el nombre de components no es diferencia gaire, tot i que també s'observa una diferència en les

concentracions. Les vitamines no acostumen a ser components limitants del medi de cultiu, i el seu consum és baix.

Per últim, en referència a la composició de suplement, aquesta varia força. El Grace és un medi que es pot obtenir amb o sense suplement, consistents en 3,33 g/L d'extracte de llevat (suplement de vitamines i aminoàcids) i 3,33 g/L d'hidrolitzat de lactalbúmina (aminoàcids). El principal problema que hi ha en aquests components és que, tant en els extractes com en els hidrolitzats de proteïnes, es desconeix la seva composició exacte i aquesta pot variar segons el proveïdor o el lot de fabricació. Un segon cas és el del TC-100, en el que es pot trobar triptona (aminoàcids). L'únic medi que no es comercialitza suplementat és el IPL-41.

Després de la indentificació de les diferents opcions de medis comercials, es procedeix a realitzar una prova experimental. Inicialment es planteja un experiment amb els medis tal i com els subministren els proveïdors, sense la presència de suplement, per tant els medis provats són: Grace, IPL-41 i TC-100, tots ells suplementats únicament amb un 5% de FBS.

L'experiment es desenvolupa en flascons agitats de cultiu de 250 ml de volum, amb un volum de medi de 50 ml, en un incubador a una temperatura de 28 °C, humitat del 95%, i una velocitat d'agitació de 60 rpm. El cultiu inòcul es fa créixer durant 48-60 hores, i la concentració d'inòcul es fixa en  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL.

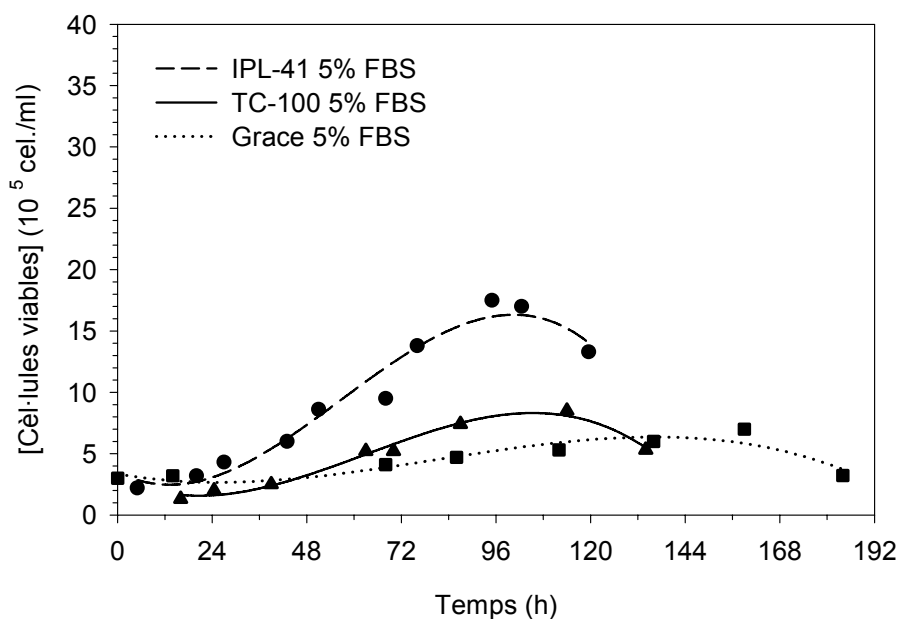


Figura 5-6: Perfils de creixement cel·lular de la soca de Sf9 emprada amb diferents medis comercials desenvolupats per a línies cel·lulars d'insecte, suplementats amb un 5% de FBS. ● IPL-41, ▲ TC-100 i ■ Grace.

La Figura 5-6 mostra els diferents perfils de creixement cel·lular obtinguts en cadascun dels medis de cultiu. Es pot observar com tant el TC-100 com el Grace, que arriben a unes concentracions finals de  $7 \cdot 10^5$ (cèl./mL) i  $5 \cdot 10^5$ (cèl./mL) respectivament, no aporten els nutrients necessaris per a suportar el creixement de la soca de Sf9.

Dels experiments s'observa que, en general, la concentració que s'assoleix és baixa en tots els casos, amb l'excepció del medi IPL-41 que mostra uns millors resultats amb una màxima densitat cel·lular de  $1,6 \cdot 10^6$  (cèl./mL). En tot cas, el fet de que tant el medi TC-100 com el Grace tinguin formulacions amb suplementes, deixen entreveure la importància dels mateixos, i per tant es planifiquen nous experiments per a estudiar-ne els efectes. De fet cal afegir també que altres autors han identificat la necessitat d'emprar suplementes (Ogonah *i col.*·1991; J Zhang *i col.*·1992).

L'estudi de l'efecte dels suplementes en el creixement de la soca de Sf9, es planteja utilitzant els mateixos suplementes en els diferents medis de cultiu, emprant doncs l'extracte de llevat i l'hidrolitzat de lactalbúmina en les mateixes concentracions, 3,3 g/L de cadascun d'ells (Figura 5-7). Així, l'experiment ha estat plantejat de la següent manera:

- Grace suplementat amb un 5% de FBS.
- IPL-41 suplementat amb 3,3 g/L d'extracte de llevat i 3,3 g/L hidrolitzat de lactalbúmina, i un 5% de FBS.
- TC-100 suplementat amb 3,3 g/L d'extracte de llevat i 3,3 g/L hidrolitzat de lactalbúmina, i un 5% de FBS.

L'experiment es realitza en flascons agitats de cultiu de 250 ml, amb 50 ml de medi que són suplementats amb addicions d'alíquotes concentrades estèrils d'extracte de llevat i hidrolitzat de lactalbúmina. Els cultius es desenvolupen en un incubador a una temperatura de 28 °C, humitat del 95%, i una velocitat d'agitació de 60 rpm. El cultiu inòcul es fa créixer durant 48-60 hores en medi Grace suplementat, i la concentració d'inòcul es fixa en  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL.

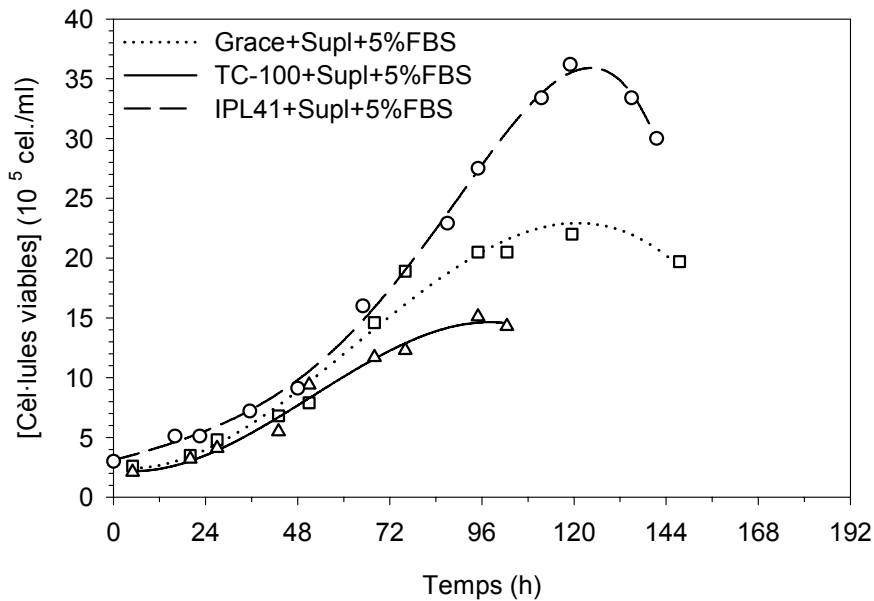


Figura 5-7: Perfils de creixement cel·lular de la soca de Sf9 emprada amb diferents medis comercials per a línies cel·lulars d'insecte, suplementats amb un 5% de FBS, Hidrolitzat de Lactalbúmina (3,3 g/L) i Extracte de Llevat (3,3 g/L). ○ IPL-41, Δ TC-100 i □ Grace.

Com es pot observar a la Figura 5-7, en els tres casos s'ha observat una millor resposta de creixement cel·lular a l'afegir-hi els suplementos. Aquest fet confirma que la presència dels suplementos en el medi és bàsica pel bon desenvolupament del cultiu, aportant una millora en cada cas aproximadament entre un 100 i un 200%. Els valors de concentració cel·lular final han estat de  $3,5 \cdot 10^6$  (cèl·l./mL) en medi IPL-41 suplementat, de  $2,25 \cdot 10^6$  (cèl·l./mL) en Grace suplementat i de  $1,5 \cdot 10^6$  (cèl·l./mL) en el cas de TC-100 suplementat.

A partir de les dades experimentals obtingudes, es selecciona el medi IPL-41, donat que és el que permet obtenir sempre els millors resultats. Per a completar la seva definició, s'estudia a continuació l'efecte del nivell de FBS en el cultiu.

Entre els fluids biològics que han demostrat tenir més efectes positius per a cultivar cèl·lules fora del cos es troba el sèrum. El sèrum és el medi on es troben els eritròcits i leucòcits *in vivo* i per tant no és sorprenent que sigui un suplement excel·lent en els cultius *in vitro* (Maurer-1986). Des dels principis del desenvolupament de la tecnologia de cultius cel·lulars els investigadors han afegit sèrum al medi bàsic de cultiu en una concentració del 1 al 20% (v/v) per a fer créixer gairebé tots els tipus cel·lulars (Shacter-1989a).



Les principals funcions del sèrum són proveir als cultius d'una sèrie de compostos amb diferents activitats que afavoreixen el creixement cel·lular a partir dels seus precursors i la producció de la proteïna d'interès (Barnes i Sato·1980; Maurer·1986). El sèrum conté també una gran varietat de components que estan poc caracteritzats o encara no s'han identificat. Malgrat aquest gran nombre de components presents al sèrum, sembla que només molt pocs són realment essencials (Glassy *i col.*·1988).

La concentració de sèrum és un factor que influencia de manera notable l'economia del procés. En primer lloc pel seu alt cost, i en les elevades quantitats en que es suplementen els medis, i en segon lloc per la complicació i encariment del procés de purificació del producte present en el brou de cultiu. El sèrum fa augmentar la viscositat del brou, cosa que dificulta el tractament d'aquest, per exemple si s'ha de filtrar o ultrafiltrar (com a primers passos de purificació). A més, el sèrum està format bàsicament per a proteïnes, que poden interferir en la purificació de la proteïna d'interès. Degut a que el producte del present bioprocés en desenvolupament és una proteïna (VP2), com menys presència de sèrum hi hagi en el brou a tractar més simple i econòmica serà la purificació (Bernard *i col.*·1996; Menge *i col.*·1987; Soley·2002).

Tenint en compte l'elevat cost del sèrum, i l'increment de la dificultat de la purificació del producte proteic, es planteja veure l'efecte de concentracions més baixes de sèrum, entre el 5 i el 2 %, sobre el desenvolupament de l'etapa de creixement cel·lular.

L'experiment es desenvolupa en flascons agitats de cultiu de 250 ml, amb un volum de 50 ml, en un incubador a una temperatura de 28 °C, humitat del 95%, i una velocitat d'agitació de 60 rpm. El cultiu inòcul es fa créixer durant 48-60 hores en medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de sèrum. La concentració d'inòcul es fixa en  $3 \cdot 10^5$  cèl/ml.

La Figura 5-8 mostra els perfils de concentració cel·lular que s'han obtingut en cadascuna de les concentracions de sèrum estudiades. Observant els nivells de concentració cel·lular assolits, es pot considerar que el comportament de les corbes dels cultius amb medi IPL-41 suplementat amb un 5, 4 i 3% de FBS són bastant similars. Així doncs, aquest resultat de l'experiment fa pensar que és possible rebaixar la concentració de sèrum fins a un 3%.

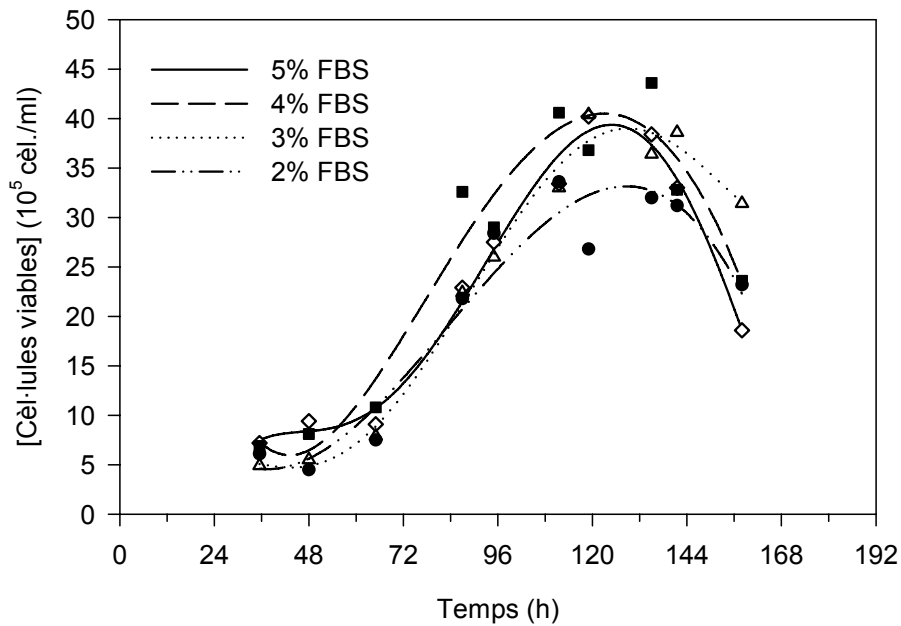


Figura 5-8: Perfils de creixement cel·lular de la soca de Sf9 emprada amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina (3,3 g/L), extracte de llevat (3,3 g/L) i amb diferents concentracions de sèrum (FBS):  $\diamond$  5%,  $\blacksquare$  4%,  $\triangle$  3% i  $\bullet$  2%.

Una anàlisi ràpida de la composició del medi de cultiu, recollida en el capítol de Materials i Mètodes, revela que el IPL-41 és un medi força complet amb 11 sals, 7 fonts de carboni, 21 aminoàcids, 11 vitamines, i suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina i extracte de llevat. Aquesta riquesa del medi podria afavorir que la concentració de sèrum necessària resulti més baixa del que és habitual en línies cel·lulars tant de mamífer com d'insecte.

Per altra banda, la corba del cultiu suplementat amb un 2% de sèrum reflexa una limitació en el creixement, ja que el màxim només assoleix una concentració propera a  $3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL (un 25% menor respecte la resta), mentre que la resta de les corbes es situen entre els  $3,5$  i  $4 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. Aquest límit segurament pot ser degut a un esgotament dels factors de creixement que aporta el sèrum.

Pel que fa a la velocitat específica màxima de creixement ( $\mu$ ), els valors corresponents a la fase de creixement exponencial, calculats a partir de l'equació 5-1 desenvolupada a partir del balanç de matèria de la concentració cel·lular, es recullen a la Taula 5-2.

$$V \cdot \mu \cdot X = \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 5-1}$$

$$\text{Ln}(X) = \text{Ln}(X_0) + \mu \cdot t$$

	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
IPL-41 suplementat i 5% FBS	0,0218
IPL-41 suplementat i 4% FBS	0,0218
IPL-41 suplementat i 3% FBS	0,0235
IPL-41 suplementat i 2% FBS	0,0213

Taula 5-2: Recull dels valors de velocitat específica màxima de creixement de Sf9 en medi IPL-41 amb diferents concentracions de sèrum fetal boví.

Com es pot observar a la taula no s'observen diferències significatives entre les velocitats específiques màximes de creixement, amb valors al voltant de 0,022 h<sup>-1</sup>. Per tant, el criteri d'elecció del percentatge de sèrum en el medi es basa en la concentració cel·lular final que s'assoleix en cadascun dels cultius. Finalment doncs, a partir de les dades obtingudes, s'ha de descartar la possibilitat de treballar per sota d'una concentració de sèrum del 3%. No obstant, s'ha de confirmar aquest resultat operant en un bioreactor, on les condicions d'operació varien substancialment, sobretot a nivell de la major presència d'esforços tallants sobre les cèl·lules, qüestió que pot modificar el seu comportament, i fer variar les conclusions fins aquí obtingudes.

Es vol, doncs, comprovar que una concentració del 3% de FBS serà adequada pel treball en bioreactor. L'experiment s'efectua en un bioreactor Braun MD de 2 litres, amb una aeració per difusor i una agitació de 60 rpm (el rang descrit està comprès entre 40 i 200 rpm), un pH de 6,2 i a una temperatura de 28°C. El medi de cultiu queda definit de la següent manera: IPL-41, suplement (3,3 g/L hidrolitzat de lactalbúmina i 3,3 g/L extracte de llevat), 3 % de FBS, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F- 68 (0,4%) i antiescumejant C (50ppm) (Figura 5-9). Paral·lelament, es realitza un control positiu amb un cultiu amb el mateix medi de cultiu, però en flascó agitad, els resultats del qual es mostren a la Figura 5-10.

L'addició de gentamicina (antibiòtic per procarïotes) és deguda a l'augment de risc de contaminació, resultat de l'increment del nombre d'operacions de manipulació del cultiu, i per tant s'afegeix com a mesura preventiva en aquests cultius. L'antiescumejant C, que té com a funció evitar la formació d'escuma produïda per l'aeració, i plurònic F- 68, que té la funció de protegir les cèl·lules dels esforços tallants generats en el reactor, són additius que s'afegeixen

habitualment en els cultius en bioreactor. Les concentracions utilitzades són les recomanades pels mateixos subministradors.

L'inòcul es prepara mitjançant un precultiu en un flascó agitat de 500 ml en un volum de treball de 300 ml, i s'inocula al bioreactor quan el cultiu es troba en la fase exponencial. La concentració inicial al bioreactor és de  $2,5 \cdot 10^5$  cèl./mL.

A la Figura 5-9 es presenten els resultats obtinguts pel que fa al creixement cel·lular. Com es pot observar, el creixement és bastant dolent. A partir d'una concentració inicial de  $2,5 \cdot 10^5$  cèl./mL, s'observa una fase de latència molt prolongada, i fins als sis dies de cultiu només s'assoleix una concentració de  $2 \cdot 10^6$  cèl./mL. A l'inici del cultiu la viabilitat (% de cèl·lules vives en el cultiu) era del 90% (valor satisfactori), però a mesura que el cultiu avança s'observa com la viabilitat va disminuint sense produir-se un augment significatiu de concentració cel·lular.

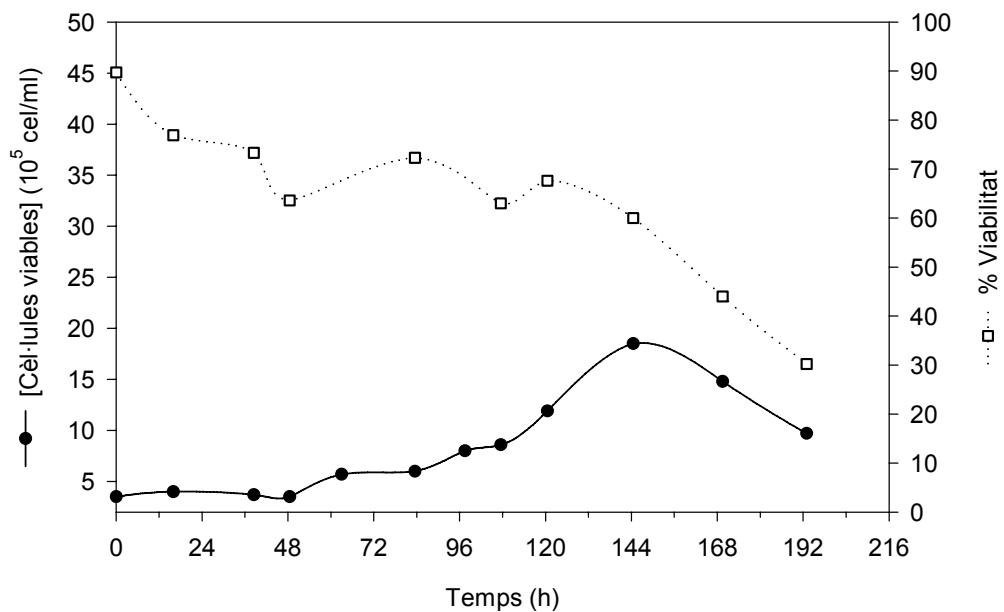


Figura 5-9: Perfils de concentració de cèl·lules viables i de la viabilitat d'un cultiu en bioreactor de la línia Sf9 amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 3% de FBS.

Aquest fet pot ser degut principalment a dos motius: l'ambient d'estrès cel·lular que en aquestes condicions d'operació per la presència d'esforços tallants massa elevats degut a l'agitació mecànica, o una altra possible causa pot ser el medi de cultiu que no és suficientment complet per a obtenir un bon creixement de les cèl·lules.

A la Figura 5-10 es mostra el control positiu del cultiu, que consisteix en un cultiu usant el mateix medi però que es realitza en un flascó agitat. Com es pot observar, el perfil que s'ha

obtingut en aquest control no s'observa una fase de latència com en el cas del bioreactor, i s'assoleix una concentració cel·lular màxima similar que en els casos que s'han estudiat anteriorment (al voltant de  $4 \cdot 10^6$  cèl./mL). Així doncs, es pot afirmar que el comportament observat en el cultiu en bioreactor amb el medi suplementat al 3% FBS és degut a l'increment d'estrès degut a la major agitació i a l'aeració del sistema del cultiu.

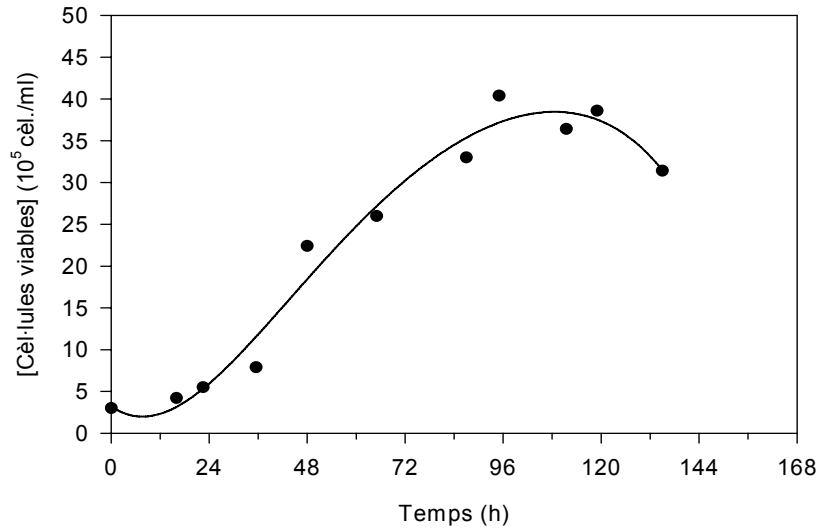


Figura 5-10: Evolució de la concentració de cèl·lules viables en el cultiu en flascó agitad de Sf9, emprant com a medi de cultiu l'IPL-41 suplementat amb 3% de FBS.

Per a poder corroborar definitivament els resultats dels experiments per a la definició del medi de cultiu a utilitzar, es realitza un nou experiment en bioreactor en el que es fixa la concentració de sèrum en un 5%.

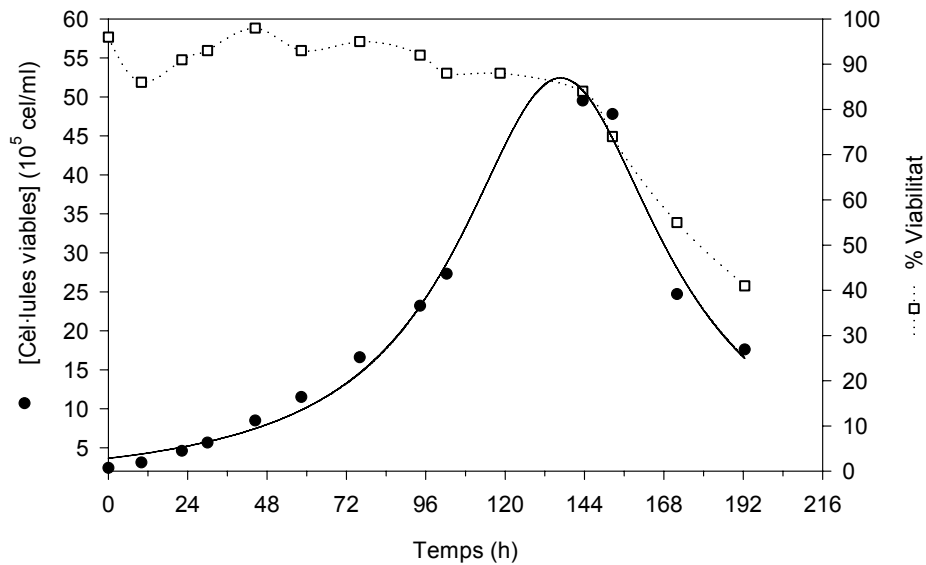


Figura 5-11: Perfils de concentració de cèl·lules viables i de la viabilitat d'un cultiu en bioreactor de la línia Sf9 amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS.

En aquest segon experiment en bioreactor s'obté un resultat satisfactori, arribant-se a un màxim de concentració cel·lular proper a  $5 \cdot 10^6$  cèl./mL, segons es pot observar a la Figura 5-11. La fase de latència és gairebé insignificant, i posteriorment fins a les 140 hores hi ha la fase de creixement exponencial. La corba de percentatge de viabilitat es manté entre un 80 i un 95 % de cèl·lules vives durant tota l'etapa de creixement, quedant confirmat l'efecte protector contra l'esforç tallant del sèrum. Després del màxim de concentració cel·lular comença la fase de mort on les dues corbes (concentració de viables i tant per cent de viabilitat), decauen ràpidament.

Per una banda, aquesta corba esdevé la referència per a avaluar els resultats que s'obtinguin d'estudiar les diferents possibles estratègies de cultiu en bioreactor per tal d'obtenir una concentració cel·lular més gran, que permeti assolir nivells més elevats de concentració cel·lular, que al mateix temps es puguin infectar pel vector d'expressió, el baculovirus, i per una altra banda el medi de cultiu per a la soca de treball queda fixat definitivament com a IPL-41 suplementat amb extracte de llevat i lactalbúmina, i amb un 5% de FBS.

No obstant, abans de poder estudiar les diferents opcions d'operació del bioreactor, és a dir, les estratègies de cultiu, s'ha de definir un sistema de monitoratge que permeti seguir l'evolució del cultiu, i posteriorment pugui ser emprat per a l'automatització i control del procés.

### **5.3. Monitoratge de cultius de Sf9-baculovirus.**

Una vegada ha estat definit el medi a utilitzar, i prèviament a estudiar i analitzar les diferents possibilitats d'estratègies d'operació en bioreactors per a assolir cultius d'alta densitat cel·lular (CADC), i per tant a priori més favorables a nivell de rendiment, s'ha de desenvolupar i implementar un sistema de monitoratge i seguiment del bioprocés. Aquest sistema de monitoratge ha de permetre obtenir informació en línia de l'estat fisiològic del cultiu, podent així definir i detectar els moments en que s'han de prendre decisions, ja sigui iniciar una estratègia de cultiu d'alta densitat, és a dir, definir el moment clau on el cultiu comença a disminuir la velocitat de creixement cel·lular, com procedir a la infecció del cultiu, o bé detectar el moment òptim de recollida del producte.

Les limitacions intrínseques de les cèl·lules animals i la complexitat del seu cultiu en bioreactors han limitat l'assoliment d'elevades densitats cel·lulars (CADC), i tot i els esforços

en el disseny d'estratègies en reactors, encara és habitual operar a baixes concentracions per a evitar riscos en l'operació.

Tanmateix, degut a l'elevat cost dels medis, i a la durada dels bioprocessos, encara hi ha una inèrcia molt important a no augmentar la seva complexitat, encara que sigui a costa de perdre una possible millora del rendiment del procés. Per aquesta raó, és d'elevat interès en aquest camp desenvolupar sistemes de monitoratge robusts i a ser possible senzills d'implementar, que minimitzin per una banda l'error de mesura, i per l'altra la possibilitat de que es produeixin contaminacions.

### **5.3.1. La mesura en els cultius cel·lulars.**

El desenvolupament dels processos de cultiu cel·lular ha posat de manifest la necessitat de mesurar de forma acurada, els paràmetres bioquímics i fisiològics que determinen el seu comportament. En Biotecnologia, en el desenvolupament d'instrumentació en línia es pot distingir entre una sèrie de variables ja consolidades, normalment de tipus fisicoquímic, com el pH, la temperatura, l'oxigen dissolt, el potencial redox, i una segona sèrie de variables que són intrínsecament més complexes i específiques, com el seguiment de la concentració i activitat cel·lular. Aquest segon tipus de mesures són especialment interessants, ja que han de poder subministrar informació valuosa sobre l'estat del cultiu, que pugui facilitar el desenvolupament de les diferents estratègies per a optimitzar els cultius. Cal remarcar que una de les causes que sovint fa que algunes d'aquestes mesures no estiguin ben desenvolupades, en el cas dels cultius cel·lulars, és el petit marge de variació que es produeix en algunes de les magnituds mesurables, degut als aspectes generals del cultiu ja discutits anteriorment (baixa velocitat de creixement, baixa concentració cel·lular, etc.).

En el decurs dels últims anys s'han proposat diversos mètodes per a la mesura en línia d'algunes de les variables més importants dels cultius de cèl·lules animals. Alguns d'aquests inclouen el monitoratge dels substrats com la glucosa (Kurokawa *i col.*·1994; Ozturk *i col.*·1997; J Wang *i col.*·1995) i la glutamina (Campmajó *i col.*·1994; J Wang *i col.*·1995), o bé subproductes del cultiu com el lactat o l'amoni (Jorgensen *i col.*·1997), emprant tècniques cromatogràfiques per HPLC o d'anàlisi FIA, acoblats en línia al bioreactor.

Altres estudis s'han centrat en desenvolupar mètodes de seguiment de la concentració cel·lular, emprant mètodes directes com la mesura de la capacitància (Guan *i col.*·1998), o bé implementant tècniques de microscòpia *in situ* (Bittner *i col.*·1998). També s'han desenvolupat

sistemes de monitoratge de variables indirectes pel seguiment de la concentració cel·lular que aporten informació sobre l'activitat cel·lular i l'estat fisiològic, com ho són entre d'altres, la velocitat de consum d'oxigen (OUR) per espectrometria de masses (Behrendt *i col.* 1994), o bé pel mètode que realitza mesures d'oxigen dissolt en un increment (Yoon i Konstantinov 1994), o a partir de la mesura del potencial redox (Eyer i Heinzle 1996; Higareda *i col.* 1997).

Un aspecte molt important és triar el sistema de monitoratge més adequat a cada procés, de caire fiable i robust, i que proporcioni informació rellevant, de tal manera que permeti prendre les decisions oportunes d'actuacions amb total seguretat. En aquest apartat es procedeix a analitzar els diferents sistemes de monitoratge aplicables al present procés de cultiu de cèl·lules d'insecte que han de ser infectades per baculovirus recombinants. De les diferents estratègies de monitoratge s'avalua la possibilitat d'implementació del seguiment del substrat principal, de la concentració cel·lular i de l'activitat cel·lular:

- Avaluació de la concentració del substrat principal (Glucosa): sistema d'anàlisi per injecció de flux. (FIA).
- Mesura de la concentració cel·lular: mètode òptic turbidimètric, Sonda Aquasant.
- Seguiment de la velocitat de consum d'oxigen mitjançant un mètode dinàmic: OUR (Oxygen Uptake Rate).

### **Anàlisi de glucosa per Injecció en Flux (FIA).**

L'anàlisi per injecció de flux en línia que es proposa utilitzar en aquest treball ha estat prèviament desenvolupat dins del mateix grup de recerca (Casablanca 2001). Consisteix en extreure una mostra lliure de cèl·lules del bioreactor, que es fa circular a través d'un cartutx on s'immobilitza un enzim que reacciona de forma específica amb el substrat. En aquest cas concret l'enzim és la glucosa oxidasa (GOD), que transforma la glucosa a àcid glucònic i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentració de peròxid d'hidrogen es mesura en un detector amperomètric podent-se quantificar la concentració de glucosa de la mostra.

La utilització d'una metodologia de seguiment de la concentració de la glucosa com a indicadors de l'activitat de les cèl·lules *Sf9*, ha de tenir en compte també la composició del mateix medi IPL-41. Tanmateix, aquest medi té set fonts de carboni, quatre minoritàries (fumarat,  $\alpha$ -cetoglutarat, malat i succinat) i tres de majoritàries, la glucosa i dos disacàrids, la maltosa i la sacarosa. La maltosa és un disacàrid en base a dos unitats de glucosa, i la



sacarosa està formada per una unitat de glucosa i una de fructosa, tal com es mostra a la Figura 5-12.

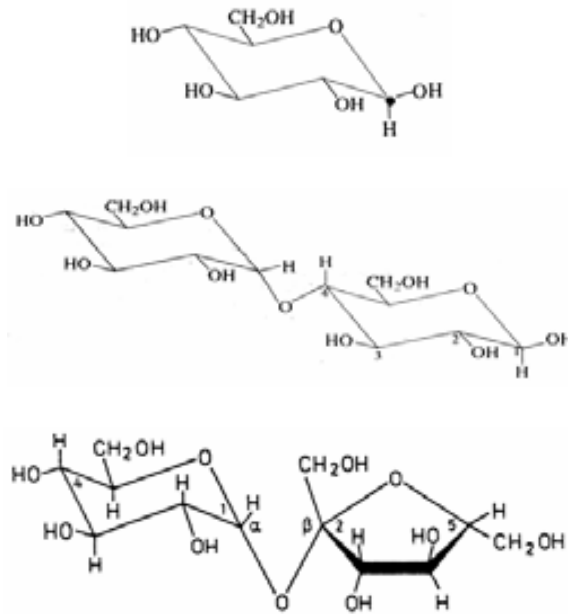


Figura 5-12: Representació de les molècules de les principals fonts de carboni del medi IPL-41 de dalt a baix: glucosa, maltosa i sacarosa.

Degut a les estructures del conjunt de sucres presents en el medi de cultiu IPL-41, és possible que la soca de *Sf9* empri més d'un substrat, o que els disacàrids s'hidrolitzin en els monosacàrids corresponents.

Cal per tant, determinar l'evolució de la concentració de la glucosa en el cultiu i veure com es pot establir una relació entre l'activitat i/o la concentració cel·lular. Per aquest motiu es presenta a la Figura 5-13 el seguiment de la glucosa en l'experiment realitzat en bioreactor mostrat anteriorment que s'ha dut a terme en medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de FBS, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F-68 (0,4%) i antiescumejant C (50ppm).

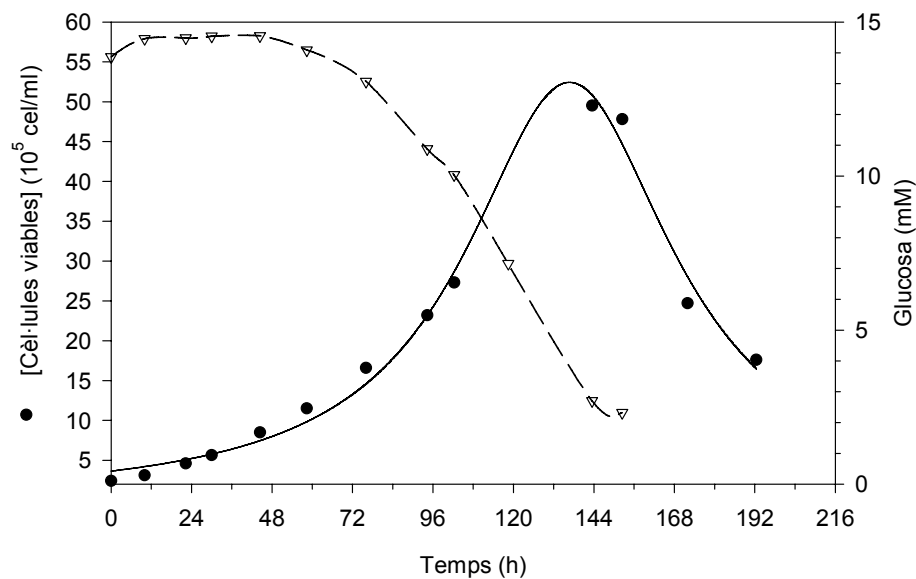


Figura 5-13: Perfils de (●) concentració cel·lular i de (Δ) glucosa del cultiu en medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de FBS, en bioreactor.

Com es pot observar, el perfil de la concentració de glucosa té dues fases molt diferenciades. En la primera, s'observa una concentració pràcticament constant, malgrat que les cèl·lules estan en fase de creixement exponencial. No és fins bastant avançada aquesta fase de creixement exponencial que s'observa una davallada substancial i continuada de la concentració de glucosa.

Aquest perfil només es pot interpretar en base a que les cèl·lules Sf9 tinguin una utilització preferent dels disacàrids, com a font de carboni, de forma que es genera glucosa de la seva hidròlisi, compensant en consum d'aquesta en la fase inicial del cultiu. Una altra opció és que es produeixi la hidròlisi directament en el medi de cultiu dels disacàrids. Aquesta interpretació coincideix amb observacions fetes en diferents estudis publicats per altres autors, que apunten que per mitjà de la hidròlisi o en presència dels enzims que hidrolitzen els disacàrids, invertasa i  $\alpha$ -glucosidasa (o maltasa), aquests es descomponen en els monosacàrids corresponents (Bedard *i col.*·1993; Ferrance *i col.*·1993). Segons els autors aquest comportament indicaria la presència dels enzims (invertasa) ja sigui en la superfície de cèl·lula o bé secretat en el medi de cultiu (Bhatia *i col.*·1996). Una vegada s'esgoten els disacàrids del medi, és quan s'observa la davallada pronunciada de la concentració de la glucosa, ja que es deixa de generar i és consumida per les cèl·lules.

Per tal d'analitzar amb més detall l'observació feta en aquest cultiu, i comprovar algunes de les hipòtesis que s'han fet sobre la utilització de les fonts de carboni per part de les

cèl·lules Sf9, s'explora la possibilitat de redissenyar el medi de cultiu IPL-41 de forma que només tingui en la seva composició una única font de carboni.

D'acord amb el proveïdor, es formula un medi bàsic sense font de carboni, per tal de poder afegir en cada cas els nivells desitjats dels diferents components, glucosa, maltosa i sacarosa, a una concentració equivalent a la concentració total del conjunt de fonts de carboni al medi IPL-41 original (5,15 g/L).

L'experiment (Figura 5-14) es desenvolupa en flascons agitats de cultiu de 250 ml, amb un volum de treball de 50 ml, en un incubador a una temperatura de 28 °C, humitat del 95%, i una velocitat d'agitació de 60 rpm. El cultiu inòcul es fa créixer durant 48-60 hores en medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de sèrum. La concentració d'inòcul es fixa en  $3 \cdot 10^5$  cèl/ml.

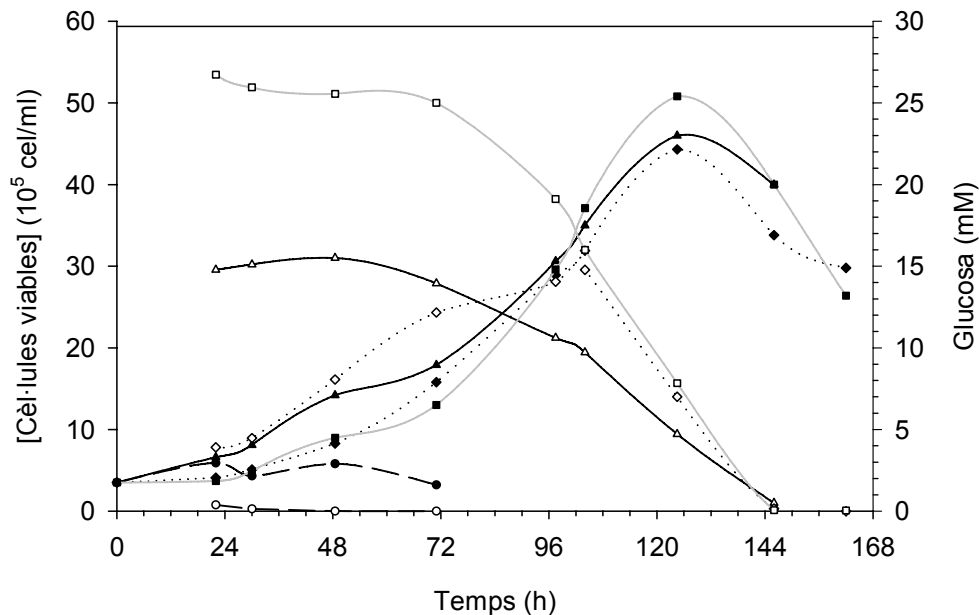


Figura 5-14: Perfils de concentració de cèl·lules viables i concentració de glucosa en cultius en flascons agitats i diferents formulacions del medi IPL-41 modificats per tal de tenir una única font de carboni. Medi IPL-41 control amb totes les fonts de carboni (▲ Cèl·lules viables, Δ Concentració de glucosa), IPL-41 amb Glucosa (■ Cèl·lules viables, □ Concentració de glucosa), IPL-41 amb Sacarosa (● Cèl·lules viables, ○ Concentració de glucosa), IPL-41 amb Maltosa (◆ Cèl·lules viables i ◇ Concentració de glucosa).

Com es mostra a la Figura 5-14, els perfils de concentració de cèl·lules viables en el cas del experiment control (medi IPL-41 comercial suplementat) i els medis IPL-41 amb glucosa i maltosa assoleixen perfils similars, amb una concentració màxima propera a  $4,5 \cdot 10^6$  cèl/ml a les 130 hores. En canvi, el medi de IPL-41 amb sacarosa no experimenta cap tipus de creixement, per tant és totalment prescindible del medi de cultiu. Aquest resultat permet afirmar que la línia cel·lular emprada no necessita més que d'una font de carboni, que podria

ser la glucosa, fet que permetria poder desenvolupar un sistema de monitoratge emprant la glucosa com a variable mesurada.

Per altra banda, si s'observa el perfil de la concentració de glucosa del medi IPL-41 amb maltosa, s'observa que hi ha una acumulació de glucosa en els primers dies del cultiu, fet que confirma que la maltosa és la font de generació de glucosa en els cultius de IPL-41 comercials, i molt possiblement al esgotar-se la maltosa el descens de la concentració de glucosa és considerable, amb un pendent similar al del cas del medi IPL-41 amb només glucosa. Finalment, en els tres casos en que s'ha observat creixement cel·lular, la glucosa s'esgota en el mateix instant, cosa que pot dur a pensar que la maltosa s'hidrolitza a l'exterior de la cèl·lula, ja que la velocitat de consum del substrat és la mateixa en els tres casos, tenint en compte que la quantitat global de font de carboni era la mateixa en tots ells.

De les dades obtingudes es poden calcular les velocitats específiques de consum o generació de la glucosa per part de les cèl·lules, representant el consum acumulat o la generació acumulada de la glucosa (en mM) respecte la integral de cèl·lules viables (ICV, que té unitats de  $10^6$  cel h/mL) (Bibila *i col.*·1994; Zhou *i col.*·1997).

$$ICV = \int_0^t X dt = \sum_{i=0}^{n-1} [\bar{X}_i (t_{i+1} - t_i)] \quad \text{Equació 5-2}$$

on  $\bar{X}_i = (X_{i+1} + X_i)/2$ ,  $X_{i+1}$  i  $X_i$  són les concentracions de cèl·lules viables ( $10^6$ cèl·lules/mL) en els temps  $t_{i+1}$  i  $t_i$ , respectivament, i  $\bar{X}_i$  és la concentració mitjana de cèl·lules viables per l'interval de temps  $(t_{i+1} - t_i)$ . Al representar el consum o producció acumulada de glucosa, respecte la ICV al llarg del cultiu, s'obtindran rectes de pendent constant en aquelles fases del creixement en què les velocitats específiques ho siguin, tal i com es mostra a la Figura 5-15.

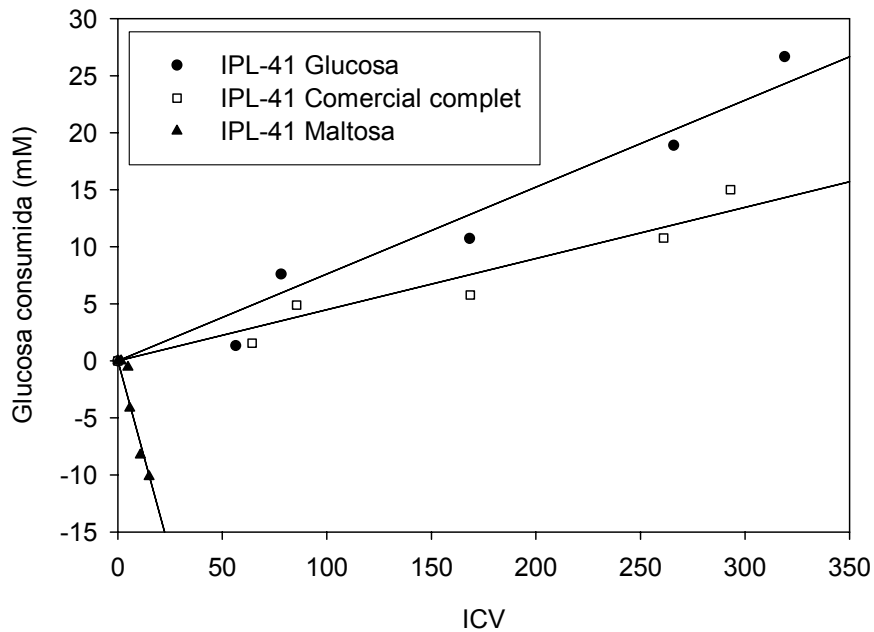


Figura 5-15: Representació del consum acumulat de glucosa (en unitats molars) vers l'integral de cèl·lules viables, per els cultius en medi IPL-41 comercial, IPL-41 amb glucosa com a única font de carboni i IPL-41 amb maltosa com a única font de carboni. El càlcul de la velocitat específica de consum correspon al pendent de la regressió lineal.

Els valors que s'han obtingut de la velocitat específica de consum de glucosa són de 76,2 nmols/10<sup>6</sup>cel·h pel cas del medi IPL41 amb únicament glucosa, i de 44,9 nmols/10<sup>6</sup>cel·h en el cas del IPL-41 complet. Aquesta diferència fa pensar que en el cas del medi IPL-41 complet, el consum de glucosa és més suau degut a la presència també de la maltosa, produint-se un consum mixt de les dues fonts de carboni quan la concentració de maltosa assoleix nivells de concentració baixos. En canvi, el valor en les fases inicials del medi IPL-41 amb únicament maltosa, la velocitat de producció de glucosa és de 199 nmols/10<sup>6</sup>cel·h, i quan la maltosa s'esgota el consum de glucosa té un valor similar al del medi amb únicament glucosa. Aquesta diferència de comportaments pot indicar que segons la presència i concentració de diferents fonts de carboni, el metabolisme de la soca experimenti algunes variacions.

### **La mesura de la concentració cel·lular: mètode òptic turbidimètric.**

La mesura i seguiment directe i en línia de la concentració cel·lular en un bioreactor és d'un interès evident i, no obstant, tot i que s'han desenvolupat tota una sèrie de tècniques, encara no es disposa d'un sistema universalment acceptat, i sobretot, que permeti mesurar tant la concentració com la viabilitat de les cèl·lules. La concentració de cèl·lules viables és

una mesura de la quantitat disponible de biocatalitzador, essent una variable clau, ja que permet determinar, entre d'altres paràmetres, la velocitat de creixement i/o la producció específica de productes i la utilització de substrat, que seran molt útils en el disseny d'estratègies eficients de control del bioprocés. Qualsevol intent d'avançar en el seguiment en línia dels bioreactors passa per a mesurar en línia la densitat cel·lular, ja sigui de forma directa com indirecta.

Entre els diferents sistemes de seguiment en línia de la concentració cel·lular, s'ha optat pels mètodes òptics. Entre els seus avantatges destaquen: resposta ràpida, bona sensibilitat, fàcil manteniment i principis físics senzills. Tot i els seus avantatges, els sensors òptics també presenten inconvenients. Un problema general és l'embrutiment de les superfícies òptiques, com a resultat de l'adhesió de proteïnes o cèl·lules. Aquest fet pot ser crític en cultius de llarga durada. A més, la majoria dels sensors òptics no distingeixen entre cèl·lules viables i no viables. La seva resposta està afectada per l'estat fisiològic del cultiu cel·lular, mida i morfologia de la cèl·lula, i per la terbolesa global del brou del cultiu, la qual depèn també de la concentració de residus i restes cel·lulars (*cell debris*), dels agregats cel·lulars i d'altres partícules d'origen no cel·lular.

El sensor òptic emprat en aquest treball es basa en la mesura de la turbidimetria del brou de cultiu a partir de la dispersió que experimenta un feix de llum, mesura que és associada a la concentració cel·lular present al medi. Es tracta de la sonda d'Aquasant AS82-AF44 CS/R (Aquasant-Messtechnik AG), que ha estat assenyalada per alguns treballs que han comparat diferents sondes com a particularment indicada en el cas de cultius cel·lulars (Konstantinov *i col.*·1992; Olsson i Nielsen·1997; Wu *i col.*·1995).

El principi del funcionament del sensor Aquasant es recull a la Figura 5-16, i consisteix en emetre un feix de llum a través d'un emissor de raigs infrarojos (AS82) consignat a 940 nm, que es transmet mitjançant un cable de fibra òptica dos feixos de raigs infrarojos (1). La sonda introdueix la radiació en el medi (2) pels dos costats al mateix temps. Una porció dels raig es dispersa pel medi de cultiu, i una altra porció és reflectida degut a la interacció amb les cèl·lules que estan en suspensió en el brou. Un receptor òptic d'alta resolució (3) envia la radiació infraroja reflectida pel brou de cultiu cap enrere, a través d'un altre cable de fibra òptica per al senyal rebut (4) a la unitat de mesura que l'avalua. La proporció entre la quantitat de llum emesa i la que es reflectida s'associa a la quantitat de cèl·lules en suspensió que hi ha en el cultiu.

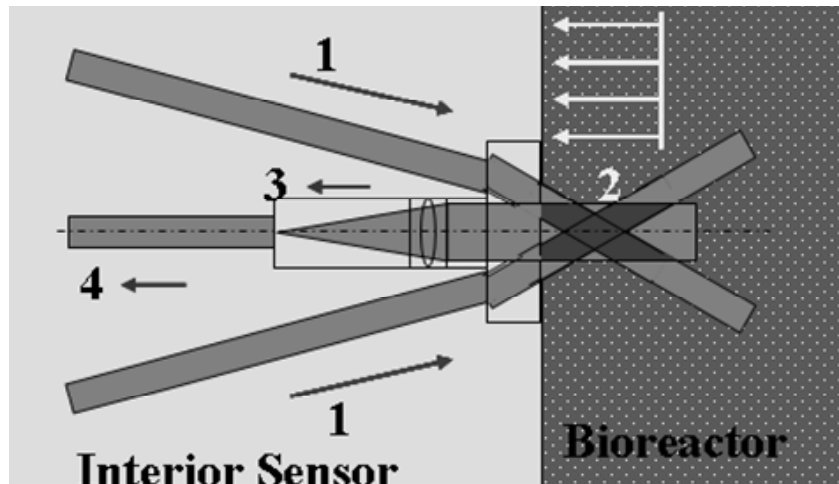


Figura 5-16: Esquema del funcionament de la sonda turbidimètrica Aquasant. A l'esquerra es situa l'interior del sensor que emet dos feixos de raigs oblics, que en part són reflectits per la turbidesa del brou de cultiu, que és el que mesura el sensor.

No obstant, aquest tipus de mesura s'acompanya sovint d'altres mesures que aportin més informació de l'estat de desenvolupament del cultiu, ja que no aporta informació de l'estat fisiològic ni de l'activitat metabòlica de les cèl·lules. Una d'aquestes mesures és la velocitat de consum d'oxigen, normalment abreujada a partir de la terminologia anglesa: OUR, Oxygen Uptake Rate.

### **Velocitat de consum d'oxigen, OUR.**

En aquest treball, seguint l'aproximació general de plantejar sistemes de monitoratge i controls senzills, i tenint en compte que els cultius de *Sf9* són de dinàmica lenta, s'ha optat per explorar també el mètode dinàmic per a la determinació de l'OUR. La velocitat de consum d'oxigen (OUR), és una mesura que aporta informació de l'activitat fisiològica de les cèl·lules en el cultiu, de la qual es pot deduir també la concentració cel·lular activa, sempre que no hi hagi cap limitació en el bioprocés.

En general, els mètodes pel monitoratge l'OUR es poden dividir en dos grups: mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase gas, i els mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase líquida. El primer grup es basa en mesurar la concentració d'oxigen en la fase gas a l'entrada i a la sortida del bioreactor. S'han emprat analitzadors de gasos (basats en el principi paramagnètic), però aquests ofereixen una sensibilitat insuficient per cultius cel·lulars (de dinàmica lenta) (Lovrecz i Gray:1994), i també

espectròmetres de masses (Dorresteyn *i col.*·1996; Eyer *i col.*·1995), que augmenta la sensibilitat tot i que continua essent insuficient en les fases inicials dels cultius, i són mètodes d'elevat cost. La tècnica principal utilitzada en el segon gran grup, basat en la mesura en la fase líquida, és la tècnica dinàmica (que es detalla més endavant), en la que només és necessari una sonda polarogràfica. En l'aplicació del balanç d'oxigen en la fase líquida en aquesta tècnica, s'assumeix que el coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen ( $k_L a$ ) i la constant de Henry són constants al llarg del cultiu, (Zhou i Hu·1994), hipòtesi que donats els nivells baixos de cèl·lules que es solen assolir en cultius cel·lulars, es pot considerar prou vàlida.

La mesura de la velocitat de consum d'oxigen en els cultius cel·lulars es basa en provocar perturbacions en el sistema d'aeració i en la concentració d'oxigen dissolt ( $pO_2$ ), com la que es mostra en la Figura 5-17, de manera que a partir del registre de les mesures de  $pO_2$  obtingudes amb la mateixa sonda amb la que es controla l'oxigen dissolt es pot estimar la relació de consum d'oxigen per part del cultiu.

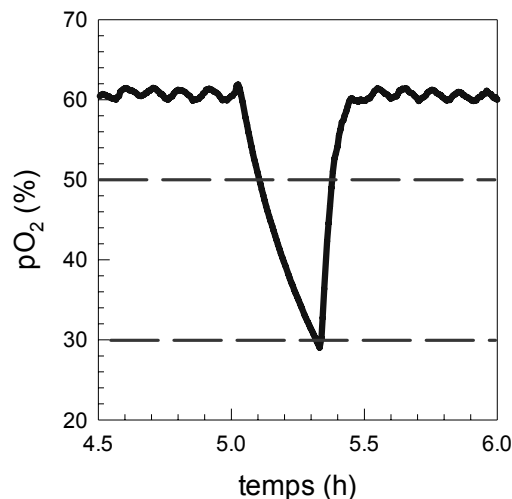


Figura 5-17: Esquema de l'evolució del perfil de la concentració d'oxigen dissolt en una perturbació provocada en un bioreactor per a la mesura de l'OUR emprant la tècnica dinàmica.

En el present treball, el valor de consigna de  $pO_2$  durant els cultius és del 60% de saturació (mesura habitual en cultius de cèl·lules animals). Per a realitzar una mesura d'OUR s'atura el sistema d'aeració i es segueix el perfil descendent de la concentració d'oxigen dissolt, conseqüència de l'activitat fisiològica de les cèl·lules. Abans d'arribar al nivell crític de concentració d'oxigen dissolt és reinicialitza el sistema d'aeració del reactor. El perfil de la davallada és degut al consum d'oxigen per part de les cèl·lules i en part també degut a la desorció del  $O_2$ , i el balanç d'oxigen dissolt s'aplica entre les dues línies horitzontals que són els extrems de l'interval de mesures emprades.



La metodologia detallada per a cadascuna de les mesures emprant la tècnica dinàmica per a la determinació de l'OUR (Figura 5-17) es resumeix a continuació:

- S'interromp el subministrament de gasos (aire, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) al sistema d'aeració.
- S'introdueix un corrent de N<sub>2</sub> per l'espai de capçal del bioreactor per a evitar la presència d'oxigen a l'espai de caps, de manera que no hi pugui haver entrada d'oxigen en el brou de cultiu per la interfase gas-líquid. El corrent de N<sub>2</sub> es manté durant tota la mesura, de manera que es pot assumir que la concentració d'O<sub>2</sub> en l'espai de capçal és nul·la, permeten calcular acuradament la quantitat d'oxigen que s'està desabsorbint.
- Es registren les lectures d'oxigen dissolt des del nivell d'operació de pO<sub>2</sub>, al voltant del 60% en tots els cultius, fins que el valor de pO<sub>2</sub> baixa al 30% de la saturació, però en tot cas superior a una concentració que pugui perjudicar o alterar el comportament cel·lular. La disminució de l'oxigen dissolt en aquest període es deu al consum d'oxigen per les cèl·lules i a la desorció de l'oxigen del medi líquid cap al capçal del reactor.
- Es tanca l'entrada de nitrogen una vegada s'ha assolit el 30% de la saturació d'aire, i es restableix el subministrament de gasos al sistema d'aeració recuperant-se el valor de pO<sub>2</sub> consigna.

El càlcul de l'OUR es determina a partir de l'aplicació del balanç de matèria per a l'oxigen dissolt en el reactor, considerant que l'entrada d'oxigen és nul·la (E=0), restant únicament els termes generació, acumulació i sortida, com es mostra en la següent equació:

$$\begin{aligned} & -G = -A - S \\ \text{OUR} &= \frac{C_{\text{O}_2}(t_0) - C_{\text{O}_2}(t_f)}{t_f - t_0} + \frac{\int_{t_0}^{t_f} (-K_{\text{des}} C_{\text{O}_2}(t)) dt}{t_f - t_0} \quad (\text{mmolsO}_2/\text{L}\cdot\text{h}) \end{aligned}$$

Equació 5-3

Sent cadascun dels termes que conformen el balanç:

## OUR

Generació: Velocitat de consum d'oxigen.

$$\frac{C_{O_2}(t_0) - C_{O_2}(t_f)}{t_f - t_0}$$

Acumulació: Variació de la concentració d'oxigen dissolt en el medi del reactor.

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

Sortida: Terme de desorció de l'oxigen dissolt en el medi del reactor. S'ha de caracteritzar la constant de desorció del sistema específica en les condicions en que es desenvolupen els experiments (bioreactor, medi, condicions de cultiu, volum...), que es suposen constants al llarg del cultiu.

La variable  $C_{O_2}(t)$  és la concentració d'oxigen dissolt en qualsevol temps de l'interval en que es realitza la mesura, i  $t_0$  i  $t_f$  són el temps inicial i final de l'interval.

A banda del seu ús directe, l'OUR sovint es combina amb altres variables per a generar indicadors de l'estat metabòlic cel·lular. Entre aquestes, les més habituals són la velocitat específica del consum d'oxigen (SOUR o  $q_{O_2}$ ), la relació entre la velocitat de consum de glucosa i l'OUR, i d'altres. Individualment o en combinació, aquestes quantitats proporcionen un coneixement més profund sobre diferents aspectes del metabolisme cel·lular. Aquesta tècnica ja ha estat implementada en el sí del grup de recerca en treballs anteriors per a al cultiu d'hibridomes (Gàmez-2000), i diferents autors l'han aplicat a diferents tipus de cultius cel·lulars amb èxit, com HEK293 (Henry *i col.* 2004), o cèl·lules d'insecte (Zeiser *i col.* 2000).

## **Selecció i implementació del sistema de monitoratge: mesures de turbidimetria i OUR.**

De les tres metodologies considerades fins al moment, es descarta ja en primera instància la mesura de glucosa en línia, fonamentalment per la seva superior complexitat, per la necessitat d'introduir un element intern al bioreactor per tal d'obtenir mostres lliures de cèl·lules (amb el corresponent risc de contaminació, i conseqüentment la menor robustesa del sistema), i finalment perquè la utilització d'aquesta mesura implica un redisseny del medi de cultiu IPL-41, que de forma comercial es proporciona amb un conjunt de set fonts de carboni diferents. Respecte als altres dos mètodes, es decideix realitzar un experiment on puguin ser provats conjuntament en un bioreactor per tal de comparar-los. Es realitza un cultiu en discontinu en bioreactor de 2 litres en el que s'utilitza el medi descrit en els apartats anteriors,

IPL-41 amb suplementes (extracte de llevat i hidrolitzat de lactalbúmina), un 5% de sèrum, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F- 68 (0,4%) i antiescumejant C (50ppm), el resultat del qual es mostra a la Figura 5-18. El cultiu es desenvolupa amb una agitació de 60 rpm, una temperatura de 28 °C, i un pH de 6,2. L'inòcul és de  $2,5 \cdot 10^5$  cèl./mL.

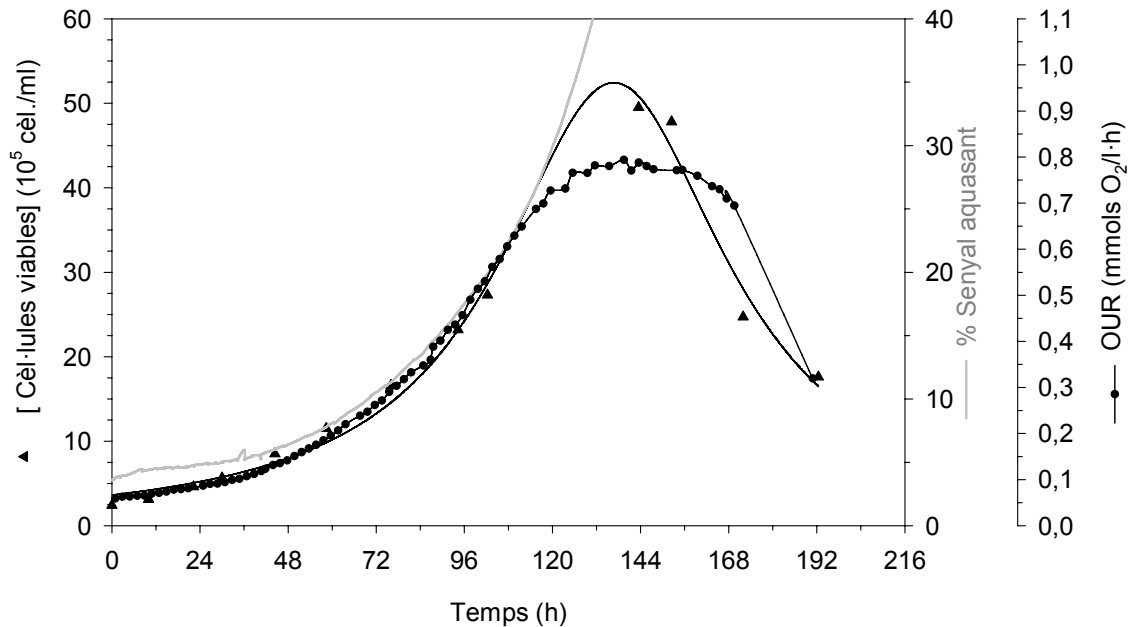


Figura 5-18: Perfils obtinguts d'una cultiu en discontinu de la soca Sf9 en medi IPL-41 suplementat, on es mostren les possibilitats de monitoratge del cultiu. ▲ Concentració de cèl·lules viables, ● mesura de l'OUR i — mesura de la sonda turbidimètrica.

En l'experiment es segueix l'evolució del creixement cel·lular amb les dues tècniques de monitoratge seleccionades, la mesura turbidimètrica i la mesura d'OUR, i s'utilitza com a mesura de referència la determinació de la concentració cel·lular per recompte directe amb microscopi mitjançant tinció amb blau de tripà, que és la mesura habitual dels anàlisis fora de línia en cultius cel·lulars.

El senyal proporcionat per la sonda turbidimètrica en la part inicial del cultiu segueix amb fidelitat el perfil de la corba de cèl·lules viables, i sembla ser un sistema força fiable. Aquest comportament es manté fins ben avançada la fase de creixement exponencial, on la viabilitat és elevada. El problema apareix en l'instant que el cultiu s'acosta al màxim de concentració cel·lular, moment en que la viabilitat disminueix i comencen a aparèixer restes cel·lulars i cèl·lules mortes en el medi. La sonda turbidimètrica mesura la terbolesa total del medi, i per tant no és capaç de discernir entre les cèl·lules vives i les mortes o restes cel·lulars, i la mesura de la sonda a partir d'aquest moment es desvia notablement de la mesura de concentració cel·lular.

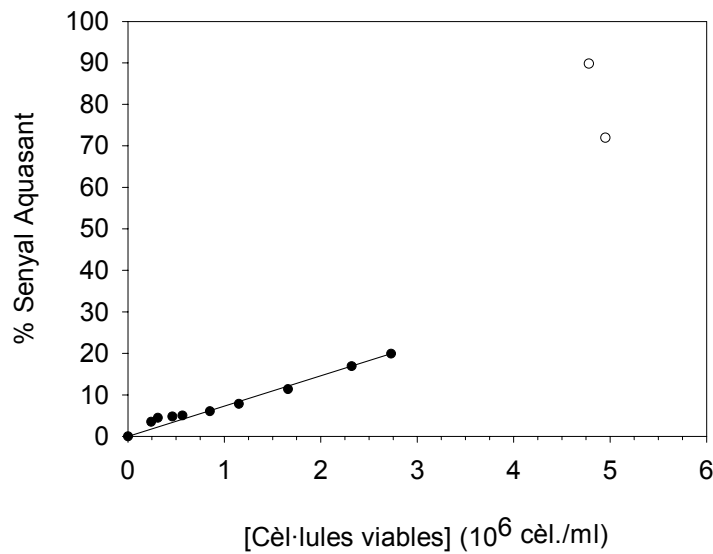


Figura 5-19: Relació entre la mesura de la sonda turbidimètrica (Aquasant) i la concentració cel·lular en el bioreactor. ● punts amb una relació lineal, ○ punts de desviació.

Aquest comportament queda reflexat a la Figura 5-19 on es representa la relació entre la concentració de cèl·lules viables i el % del senyal de la sonda turbidimètrica. Com es pot observar, en la fase inicial del cultiu, on el seguiment que proporciona la sonda és correcte, la relació entre els dos paràmetres descriu un comportament lineal, però a mesura que s'assoleix al màxim de concentració la linealitat desapareix, i no és possible correlacionar la mesura amb la concentració de cèl·lules viables. Així doncs aquest sistema de monitoratge només seria útil per a realitzar el seguiment de cultius en la fase exponencial, i en general en sistemes on la viabilitat cel·lular sigui elevada. A mesura que disminueix la viabilitat, la mesura es desvia de forma progressiva i ja no es representativa del desenvolupament del cultiu.

Pel que fa a la mesura de la velocitat de consum d'oxigen, aquesta descriu una corba molt semblant al perfil de cèl·lules viables (Figura 5-18). A l'inici del cultiu els valors d'OUR són molt baixos (al voltant 0.05 mmols/L·h) degut a la baixa concentració cel·lular disponible en el cultiu. A mesura que augmenta la concentració de cel·lular activa en el reactor, els valors de l'OUR també augmenten, fins arribar a un màxim de 0.8 mmols  $O_2$  / L·h. Un cop assolit el màxim, es manté aproximadament constant durant unes 40 hores, i després decau de forma paral·lela a la corba de cèl·lules viables.

En la zona on es dibuixa el màxim, el perfil de l'OUR és més suau que la corba de concentració de cèl·lules viables. Aquest fet és degut a que l'OUR segueix l'activitat cel·lular, i

en el màxim del perfil de la concentració de cèl·lules viables, l'activitat metabòlica comença a limitar-se, però no obstant les cèl·lules encara no estan mortes. Aquest fet és precisament una de les principals avantatges del seguiment de l'OUR, que s'avança a la detecció del canvi de tendència que correspon a l'inici de la limitació del cultiu, i ho fa en línia i oferint millor precisió que el recompte cel·lular. Per tant, el perfil que aporta la mesura d'OUR manté el mateix aspecte que el perfil descrit pel recompte cel·lular, mostrant-se com una bona eina pel seguiment del desenvolupament del cultiu. A més, el monitoratge de l'OUR disposa d'avantatges respecte el recompte de cèl·lules viables afavorint la robustesa del sistema, com ara la no necessitat de extreure mostres del bioreactor (reducció del risc de contaminació), la possibilitat de disposar d'una mesura cada hora en comptes de cada 12 o 24 hores, i finalment la reducció de l'error experimental del recompte.

La representació de l'OUR en front de la mesura de la concentració de cèl·lules viables per recompte directe (Figura 5-20), mostra la relació lineal que és manté constant durant tota la fase de creixement exponencial. No obstant, quan aquesta s'acaba per l'aparició d'alguna limitació en el cultiu, es reflexa en una pèrdua de linealitat i per tant hi ha una variació de la velocitat específica de consum d'oxigen, que com es pot observar, fa que les mesures obtingudes es situïn per sota de la recta que descriu la fase de creixement exponencial.

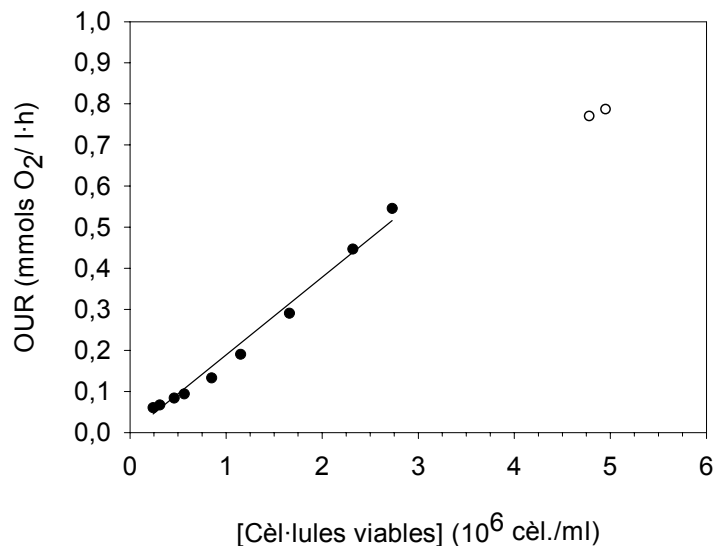


Figura 5-20: Relació entre la mesura de l'OUR i la concentració cel·lular en el bioreactor, on hi ha una fase amb una relació lineal corresponents en un cultiu sense limitacions (●), i una on apareix una limitació que fa variar la velocitat específica de consum d'oxigen (○).

Un altre paràmetre fisiològic important en el cultiu cel·lular que es pot calcular a partir del monitoratge de l'OUR, és la velocitat específica de consum d'oxigen, la  $q_{O_2}$ , que s'obté de correlacionar l'OUR amb la concentració de cèl·lules viables en el bioreactor.

Un altre terme interessant a tenir en compte és el canvi de valor de la  $q_{O_2}$  en la fase final del cultiu, que coincideix amb el punt d'inflexió de la corba de l'OUR, moment en què comença a disminuir l'activitat fisiològica del cultiu. Aquest moment és caracteritzable amb més anticipació que no pas emprant les mesures de recompte de cèl·lules viables, fet que aporta avantatges a aquest sistema de monitoratge.

El càlcul de la la velocitat específica del consum d'oxigen ( $q_{O_2}$ ) es pot obtenir a partir de del càlcul del pendent entre la variació del valor de l'OUR i la variació de la concentració cel·lular corresponent tal i com es mostra a la següent equació:

$$q_{O_2} = \frac{dOUR}{dX_v} \quad \text{Equació 5-4}$$

Per tal d'obtenir un valor acurat de la velocitat específica de consum d'oxigen, s'utilitza dades que han estat obtingudes de diferents cultius en la fase de creixement exponencial que s'han monitorat en aquest treball, tal com es mostra a la Figura 5-21.

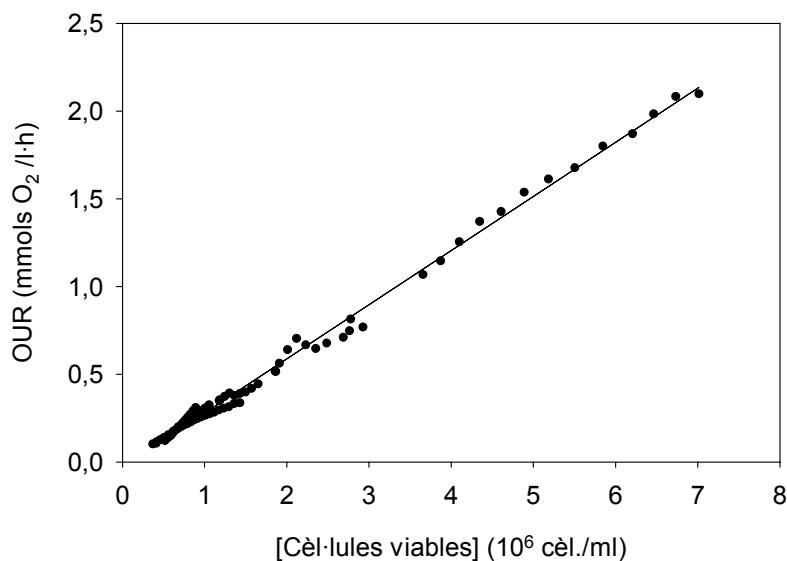


Figura 5-21: Càlcul de la velocitat específica de consum d'oxigen ( $q_{O_2}$ ), a partir de la relació de l'OUR i les cèl·lules viables en l'etapa de creixement exponencial. Les dades han estat extretes de cultius en discontinu, en continu alimentat i en perfusió. El valor del pendent que correspon a la velocitat de consum és de  $q_{O_2} = 8,56 \cdot 10^{-11}$  mol/( $10^6$  cel·s).

En el cas concret el valor de és de  $q_{O_2} = 8,56 \cdot 10^{-11}$  mol/( $10^6$  cel·s) que correspon al pendent de la recta que s'ha obtingut en la figura anterior, valor corresponent als cultius creixent sense limitació. Aquest valor es situa dins del rang de valors de soques de Sf9

descrits en la bibliografia, que oscil·len entre  $4,2 \cdot 10^{-11}$  i  $1,2 \cdot 10^{-10}$  mol/( $10^6$ cèl·s) (Kamen i col.·1996b; Palomares i Ramírez·1996).

D'aquesta manera s'obre la possibilitat de dissenyar una metodologia de seguiment de cultius que determini la velocitat específica de consum d'oxigen ( $q_{O_2}$ ) al llarg del cultiu, fent possible detectar el moment en que el valor de la  $q_{O_2}$  decreix, indicant un canvi del metabolisme cel·lular, fet que permetria actuar abans de que el cultiu entrés en una fase irreversible de mort.

Una vegada definit i implementat el sistema que permet avaluar l'evolució i el bon desenvolupament dels cultius, s'haurà d'explorar el seu possible ús en el monitoratge del procés infectiu i determinar el moment d'aturada i de recollida del brou de cultiu (TOH, Time of harvesting, o TPI, Time post infection), per posteriorment iniciar la recuperació i purificació del producte, la proteïna recombinant VP2.

## **5.4. Estratègies de cultiu.**

En les seccions anteriors s'ha definit el medi de cultiu més idoni i que ofereix un millor rendiment des del punt de vista de la concentració cel·lular generada, i un sistema de monitoratge que permet seguir el desenvolupament del cultiu. Amb l'objectiu de desenvolupar cultius d'alta rendibilitat, s'enfoca aquesta nova secció, en la que es pretén l'avaluació de diferents estratègies per assolir cultius d'alta densitat cel·lular (CADC), per tal de disminuir els volums de producció, i conseqüentment els costos productius i de purificació. És parteix d'un cultiu control que ofereixi una referència comparativa, un cultiu en discontinu, i a continuació es passa a definir i explorar estratègies alternatives de cultiu (discontinuu fortificat, discontinuu alimentat i perfusió) els esquemes de les quals es mostren a la Figura 5-22. En primer lloc, l'objectiu es centra en l'assoliment d'una alta concentració de cèl·lules disponibles per a poder ser infectades, i posteriorment s'explorà l'eficiència infectiva en cadascuna de les estratègies provades en que s'hagin obtingut resultats satisfactoris.

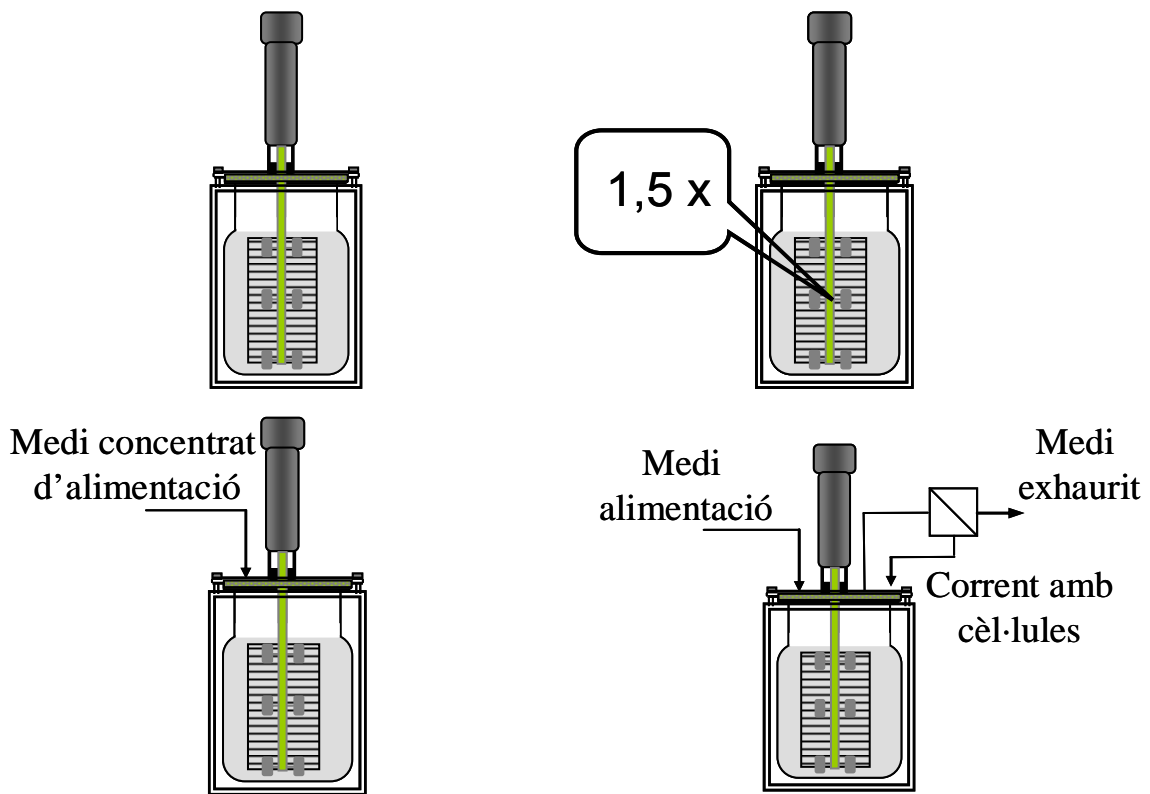


Figura 5-22: Esquema de les diferents estratègies de cultiu d'un bioprocés (d'esquerra a dreta, i de dalt a baix): operació en discontinu, discontinuu fortificat, en discontinuu alimentat i finalment cultiu en perfusió

L'estratègia més simple i més emprada en el món industrial és l'operació en discontinu, que consisteix en carregar el medi de cultiu al bioreactor, i un cop inoculat es limita a mantenir les condicions fisico-químiques de cultiu desitjades. La segona estratègia que es mostra consisteix també en una estratègia en discontinu, però amb la diferència que el medi té una concentració més elevada de nutrients, en concret 1,5 vegades superior, que ha de permetre dotar de més substrats i assolir més concentració cel·lular, i explorar una possible inhibició per substrats. L'estratègia en discontinuu alimentat es basa en l'addició de substrats al medi de cultiu al llarg del bioprocés, i és especialment indicat en el cas que de que l'aturada del cultiu en discontinuu s'hagi produït per un exhauriment d'algun nutrient, o en cas d'inhibició per algun subproducte d'oxidació incompleta, si es planteja una addició que limiti la font de carboni de manera que força l'assimilació del subproducte. Finalment l'operació en perfusió consisteix en abastir de forma contínua medi fresc al bioreactor, i simultàniament eliminar el medi exhaurit, tot retenint les cèl·lules a l'interior. Aquest sistema es planteja com el més adient en el cas que les causes de la limitació dels cultius sigui provocada per l'acumulació d'algun subproducte tòxic, ja que aquest serà eliminat en el corrent de sortida del medi exhaurit, evitant així la seva acumulació en el brou de cultiu. Normalment el procés s'inicia en una fase en discontinuu, i



abans de que es produeixi un comportament advers del cultiu, s'inicia el procés d'alimentació en continu.

### 5.4.1. Cultiu en discontinu.

Els resultats obtinguts pel cultiu discontinu de referència es presenten a la Figura 5-23. El cultiu es realitza en un bioreactor Braun MD de 2 litres amb medi IPL-41 amb els suplementes anteriorment definits i amb un 5% de FBS, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F- 68 (0,4%), antiescumejant C (50ppm).

El cultiu es desenvolupa amb una agitació de 60 rpm, , una temperatura de 28 °C, un pH de 6,2, i un valor de consigna d'oxigen dissolt del 60%. L'inòcul és de  $2,5 \cdot 10^5$  cèl/mL.

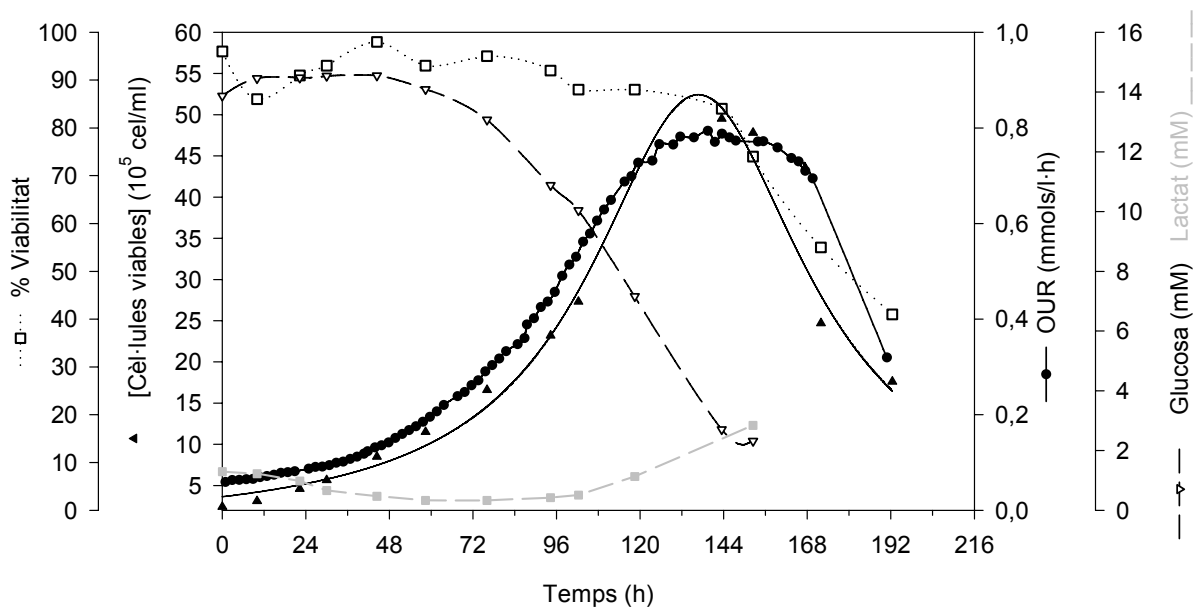


Figura 5-23: Perfils de concentració de cèl·lules viables (▲), OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□), concentració de glucosa (mM) (Δ) i de lactat (mM) (■) en un cultiu en discontinu en bioreactor amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS.

En el cultiu en discontinu s'assoleix una concentració cel·lular màxima de  $5 \cdot 10^6$  cèl/mL cap a les 140 hores de cultiu, i a partir d'aquest moment la concentració de cèl·lules viables decau ràpidament. Si s'observa la corba de % de viabilitat és pot comprovar com el valor oscil·la entre el 85 i el 100% de viabilitat en tot el període des de la inoculació fins el final de la fase exponencial, on comença a disminuir el seu valor, aproximadament a les 96-100 hores de

cultiu. L'oscil·lació del valor de viabilitat és deguda a l'error intrínsec a la tècnica del recompte directe per tinció de blau de tripà.

El perfil d'OUR que s'ha obtingut és homòleg al perfil de concentració cel·lular, tal i com s'havia pogut observar en la secció anterior del present capítol. Els valors d'OUR en l'inici del cultiu són d'aproximadament 0,065 mmols/L·h i s'incrementen paulatinament fins assolir al seu màxim al voltant de 0,8 mmols/L·h. De manera qualitativa s'observa que cap a les 100 hores de cultiu, coincidint amb l'inici de la davallada del valor de viabilitat cel·lular, la corba d'OUR mostra el punt d'inflexió, o l'inici de la disminució de la velocitat d'increment del valor de l'OUR, fet que confirmaria la capacitat del sistema de monitoratge, amb un tractament de les dades adequat, per a detectar el moment en que es produeixen les limitacions de creixement del cultiu.

Referent a la concentració de glucosa present en el medi de cultiu, s'observa com en les fases inicials aquesta no es consumeix, o fins i tot augmenta lleugerament, degut a l'hidròlisi de la maltosa. Es pot observar la presència d'una concentració de 7 mM de glucosa (aproximadament 1,3 g/L), en el final de l'etapa de creixement i l'inici de la fase de mort, que indiquen que la limitació del cultiu no és causada per un esgotament de la font de carboni principal. Aquesta és una característica no habitual, ja que la majoria dels medis de cultiu estan balancejats de manera que la limitació del medi vingui donada per la font de carboni. No obstant, encara no es coneix amb certesa el motiu de la limitació del cultiu, ja que podria ser l'esgotament o degradació d'algun nutrient, o bé una acumulació d'algun tòxic provinent de l'acumulació d'algun subproducte del metabolisme de les cèl·lules d'insecte. En aquest sentit es pot descartar que l'aturada sigui causada per l'acumulació de lactat (metabòlit generat en els cultius cel·lulars que sovint és el causant d'inhibicions), ja que quan s'inicia la frenada la concentració de lactat és fins i tot inferior a l'inicial, amb uns valors inferiors a 1 mM.

#### **5.4.2. Cultiu en discontinu fortificat.**

A continuació s'explora l'estratègia en discontinu fortificat, amb un increment de la concentració de substrats en el medi de cultiu de 1,5 vegades respecte la composició inicial. Aquesta estratègia ha de servir, per una banda, per a descartar que no hi hagi una limitació d'algun substrat, i per una altra, per a observar que no existeixi inhibició per substrat, fet que hauria de tenir-se en compte al explorar l'estratègia en discontinu alimentat.

El cultiu es desenvolupa en un bioreactor de 2 litres amb medi IPL-41 suplementat amb extracte de llevat i hidrolitzat de lactalbúmina, i amb un 5 % de FBS, amb una concentració de medi i suplement 1,5 vegades més elevada que en els cultius en discontinu, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F- 68 (0,4%), antiescumejant C (50ppm).

A la Figura 5-24 es representen els perfils de concentració de cèl·lules viables, viabilitat cel·lular, OUR, i concentració de glucosa i lactat del discontinu fortificat, observant-se directament un patró de comportament similar al discontinu.

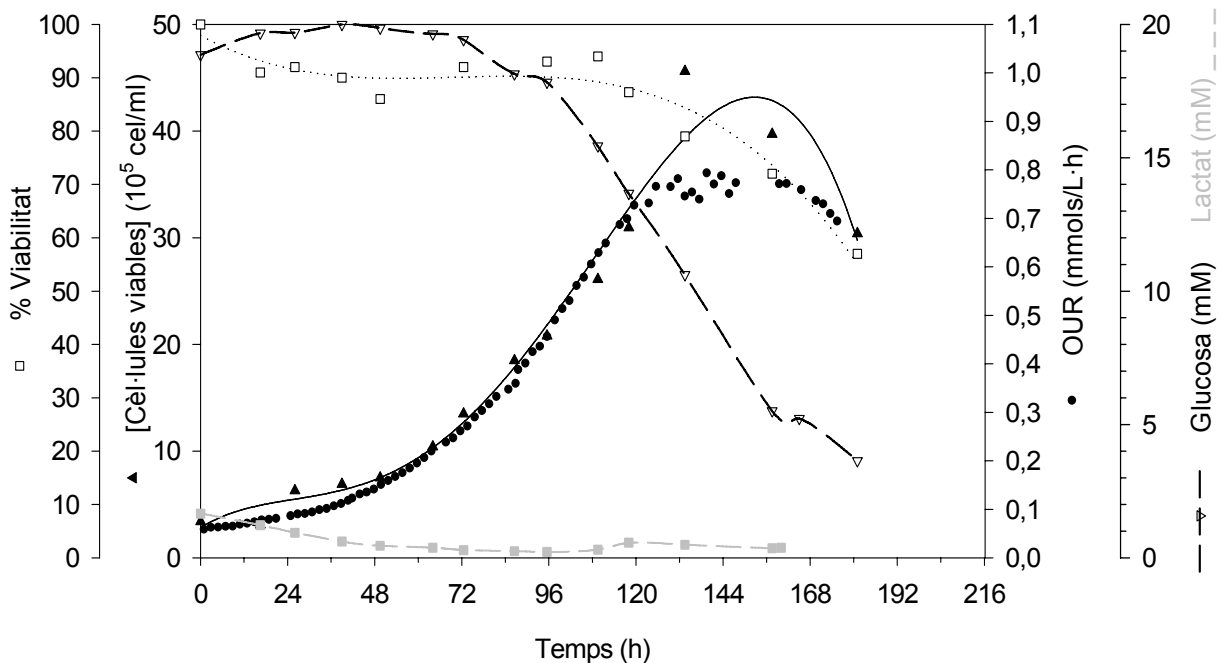


Figura 5-24: Perfils de concentració de cèl·lules viables (▲), OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□), concentració de glucosa (mM) (Δ) i de lactat (mM) (■) en un cultiu en discontinu fortificat en bioreactor amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS.

Una anàlisi més detinguda, mostra el valor màxim d'OUR de 0,8 mmols/L·h situat entre les 120 i les 144 hores, i l'inici de la fase de desacceleració del creixement es localitza sobre les 96 hores, moment en que el valor de l'OUR està proper als 0,5 mmols/L·h. Aquest comportament s'ha observat en el cas presentat anteriorment, on la diferència principal respecte aquest cultiu és la quantitat de nutrients addicionada. Per tant, es pot descartar definitivament la hipòtesi de limitació per exhauriment d'algun substrat, tot i que encara resta la possibilitat de que hi hagi algun substrat que es degradi durant el cultiu, o algun subproducte que esdevingui tòxic.

Tanmateix, aquest experiment descarta la idea de que hi pogués existir una inhibició causada per la major concentració de substrats inicials en el medi, ja que en els estadis inicials no s'observa que hi hagi cap efecte negatiu sobre el creixement cel·lular, per tant en la propera estratègia de discontinu alimentat aquest risc no existirà,.

### 5.4.3. Cultiu en discontinu alimentat.

Per a poder aplicar aquesta estratègia de cultiu en que s'ha d'addicionar medi fresc concentrat, cal disposar d'una mesura en línia de la concentració i activitat cel·lular, en el present cas l'OUR, de manera que es puguin realitzar les addicions de medi fresc de forma proporcional al nombre de cèl·lules present en el cultiu en cada moment, i les seves característiques com ara la velocitat de creixement i els consums específics de substrats. Per a portar a terme aquesta estratègia s'ha utilitzat un programari específic de control desenvolupat en la plataforma LabWin.cvi en el si del grup de recerca (Gàmez-2000), que s'adapta a la soca de Sf9.

El sistema de control d'addició es basa en realitzar de forma iterativa el protocol de d'anàlisi de mesura d'OUR. En funció del valor d'OUR calculat en línia, es calcula la concentració cel·lular present en la iteració (*i*), i es calcula també la velocitat específica de creixement en aquest període. L'estimació de la concentració cel·lular *i*, per tant, el càlcul de la velocitat específica de creixement entre dues addicions, es realitza a partir del valor de la velocitat específica de consum d'oxigen, com mostra l'equació:

$$X_v = \frac{1}{10^3} \cdot \frac{\text{OUR}}{q_{O_2}} \quad \text{Equació 5-5}$$

El seu valor ha estat determinat anteriorment, prenent com a valor de  $q_{O_2}=308,16\text{nmols}/(10^6\text{cel h})$ , i com s'ha mostrat a la Figura 5-21 es pot considerar que es manté constant al llarg de la fase de creixement exponencial del cultiu, quan no hi ha cap limitació en el creixement cel·lular.

Amb el valor d'OUR és possible calcular la concentració del consum d'oxigen acumulat mitjançant la integració de la mesura d'OUR amb el temps, tal com es mostra en l'equació proposada (Zhou i Hu-1994):

$$OC = \int_0^t OUR dt \quad \text{Equació 5-6}$$

On OC és el valor del consum d'oxigen acumulat en unitats de concentració (mM), OUR és el valor de la velocitat específica de consum d'oxigen mmols/(l·h) i finalment (t) és el temps en hores. A partir del valor de la concentració del consum d'oxigen acumulat, és possible calcular el consum acumulat de glucosa si es disposa del valor del rendiment del consum de l'oxigen respecte el consum de glucosa  $Y_{O-Glc}$ . Per a calcular-ho és necessari disposar del valor de la velocitat específica de consum de glucosa. El medi IPL-41, com ja s'ha discutit anteriorment té set fonts de carboni diferents, qüestió que complica el sistema d'addició basat en una sola font de carboni. No obstant, el medi d'addició és un medi concentrat quatre vegades i només compta amb una única font de carboni, la glucosa. A més, el sistema d'addicions s'inicialitza a mitja fase de creixement exponencial del cultiu, concretament quan s'assoleix un valor d'OUR de 0,6 mmols/L·h, moment en que s'ha esgotat majoritàriament la maltosa del medi. Així doncs, com a primera aproximació es pot considerar que la fase alimentada es desenvolupa amb la glucosa com a única font de carboni. Tanmateix, el valor de la velocitat específica de consum de glucosa és de 76,2 nmols/10<sup>6</sup>cel·h, que correspon al que ha estat calculat en el medi IPL-41 amb glucosa com a única font de carboni, com es mostra a la Figura 5-15.

Finalment, només resta calcular el paràmetre que relaciona el consum relatiu d'oxigen en funció de la glucosa consumida, és a dir, el rendiment de consum d'oxigen-glucosa. Aquest rendiment es pot calcular com la relació de les velocitats específiques de consum, com mostra la següent equació:

$$Y_{O_2/Glc} = \frac{q_{O_2}}{q_{Glc}} \quad \text{Equació 5-7}$$

El valor concret per a la soca de cèl·lules d'insecte *Sf9* utilitzada en el present treball és de  $Y_{O_2/Glc} = 4,04 \text{ mol O}_2/\text{mol Glc}$ .

Així doncs, el sistema de control per a l'addició de medi fresc s'inicia amb l'estimació de la concentració actual de glucosa en el bioreactor ( $Glc_{r,i}$ ) a partir del balanç màssic de glucosa. Aquesta estimació necessita disposar dels valors de la concentració de glucosa al reactor en el temps anterior ( $Glc_{r,i-1}$ ), la glucosa addicionada pel sistema de control en l'anterior actuació

( $Glc_{add,i-1}$ ), i la glucosa consumida en l'interval de temps ( $Glc_{cons,i}$ ), tal com mostra l'equació, on totes les concentracions de glucosa s'expressen en unitats de mM:

$$Glc_{r,i} = Glc_{r,i-1} + Glc_{add,i-1} - Glc_{cons,i} \quad \text{Equació 5-8}$$

El valor de la glucosa consumida s'estima amb les mesures d'OUR actual ( $OUR_i$ ) i l'anterior ( $OUR_{i-1}$ ), que permeten calcular el valor del consum d'oxigen acumulat ( $OC_i$ ) en l'interval de temps ( $t_i - t_{i-1}$ ), i es divideix per la relació estequiomètrica del consum entre l'oxigen i la glucosa ( $Y_{O_2/Glc}$ ) com es mostra a la següent equació:

$$Glc_{cons,i} = \frac{OC_i}{Y_{O_2/Glc}} = \frac{(OUR_i + OUR_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2 \cdot Y_{O_2/Glc}} \quad \text{Equació 5-9}$$

On el  $OC_i$  s'expressa en unitats de  $mmolO_2/L$ , el  $Y_{O_2/Glc}$  en  $mmolO_2/mmolGlc$ , l' $OUR_i$  i  $OUR_{i-1}$  en  $mmolO_2/(l \cdot h)$  i el temps  $t_{i-1}$  i  $t_i$  en hores.

El valor de  $Glc_{r,i}$  obtingut anteriorment es compara amb el valor de glucosa consigna (set-point) ( $Glc_{sp}$ ) i a la diferència resultant se li afegeix el valor de glucosa que es preveu que serà consumida en el següent interval de temps ( $Glc_{pred,i}$ ). El model de predicció de futur consum de glucosa es basa en el càlcul de la integral de cèl·lules viables, projectada des del temps actual ( $t_i$ ), fins a un temps futur ( $t_{i+1}$ ), anomenada  $ICV_{i+1}$ , i la velocitat específica del consum de glucosa ( $q_{Glc}$ ), que s'assumeix constant al llarg de la fase exponencial (Zhou *et al.* 1997).

$$Glc_{pred,i} = q_{Glc} \cdot ICV_{i+1} \quad \text{Equació 5-10}$$

sabent que 
$$ICV_{i+1} = \frac{(X_{i+1} + X_i)(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

La relació entre  $X_{i+1}$  i  $X_i$ , concentracions cel·lulars a  $t_{i+1}$  i  $t_i$  respectivament, s'obté a partir de la cinètica de creixement, considerant-se el volum constant entre addicions (en cultiu cel·lular, el volum final del discontinu alimentat no supera un 10% del volum total), com segueix:

$$X_{i+1} = X_i \exp(\mu \cdot \Delta t_{i+1}) \quad \text{Equació 5-11}$$

Substituint aquesta expressió a l'equació 5-10, i agrupant els termes s'obté la següent fórmula:

$$\mathbf{Glc}_{pred,i} = \frac{q_{Glc} 10^3 X_i [1 + \exp(\mu_i \Delta t_{i+1})] \Delta t_{i+1}}{2} \quad \text{Equació 5-12}$$

On l'interval de temps  $\Delta t_{i+1}$  es defineix com  $\Delta t_{i+1} = t_{i+1} - t_i$  i s'expressa en unitats d'hores (h),  $q_{Glc}$  en  $\text{mmol}/(10^6 \text{cèl} \cdot \text{h})$ ,  $X_i$  en  $10^6 \text{cèl}/\text{mL}$ ,  $\mu_i$  en  $\text{h}^{-1}$  i  $\text{Glc}_{pred,i}$  en mM. Com es pot observar a l'equació, es necessita conèixer la velocitat específica de creixement pel temps actual ( $\mu_i$ ), que es determina a partir de l'estimació de la concentració cel·lular feta amb la mesura d'OUR. Una vegada es prediu la concentració requerida de glucosa ( $\text{Glc}_{pred,i}$ ) per al pròxim interval de temps, el seu valor se suma a la diferència (Dif.) anteriorment calculada, obtenint-se el valor de glucosa que cal addicionar al cultiu ( $\text{Glc}_{add,i}$  en unitats de mM), expressant-se com:

$$\mathbf{Glc}_{add,i} = \mathbf{Glc}_{pred,i} + \mathbf{Dif.} = \mathbf{Glc}_{pred,i} + (\mathbf{Glc}_{sp} - \mathbf{Glc}_{r,i}) \quad \text{Equació 5-13}$$

Finalment es converteix la concentració de glucosa necessària per a les cèl·lules en el pròxim interval de temps,  $\text{Glc}_{add,i}$ , en un volum de solució d'aliment ( $V_{add,i}$ ) que s'addiciona en forma de pols en un temps prefixat,  $t_{pols}$ , donant com a resultat un valor de cabal per a la bomba FE-211,  $Q_{add,i}$ . L'expressió que pren la llei de control pel cabal a addicionar és:

$$Q_{add,i} = \frac{V_{add,i}}{t_{pols}} = \frac{\mathbf{Glc}_{add,i} V_{r,i}}{t_{pols} \mathbf{Glc}_{aliment}} \quad \text{Equació 5-14}$$

On  $\text{Glc}_{aliment}$  és la composició de glucosa en la solució d'addició,  $t_{pols}$  té un valor de 1 minut, i  $V_{r,i}$  és el volum del bioreactor (ml). Fent un balanç màssic del reactor s'obté la següent expressió que permet determinar el valor del volum de líquid per a qualsevol temps  $t_i$ :

$$V_{r,i} = V_{r,i-1} + V_{add,i-1} + V_{NaOH,i} - V_{mostra,i-1} \quad \text{Equació 5-15}$$

On  $V_{r,i-1}$  és el volum del reactor en el temps anterior,  $V_{add,i-1}$  és el volum de solució addicionada en l'anterior acció de control,  $V_{NaOH,i}$  és el volum de solució de NaOH afegit durant el període  $t_i - t_{i-1}$ , i  $V_{mostra,i-1}$  és el volum de mostra per a l'anàlisi fora de línia (5 ml).

El llaç de control exposat es mostra de forma esquematitzada a la Figura 5-25.

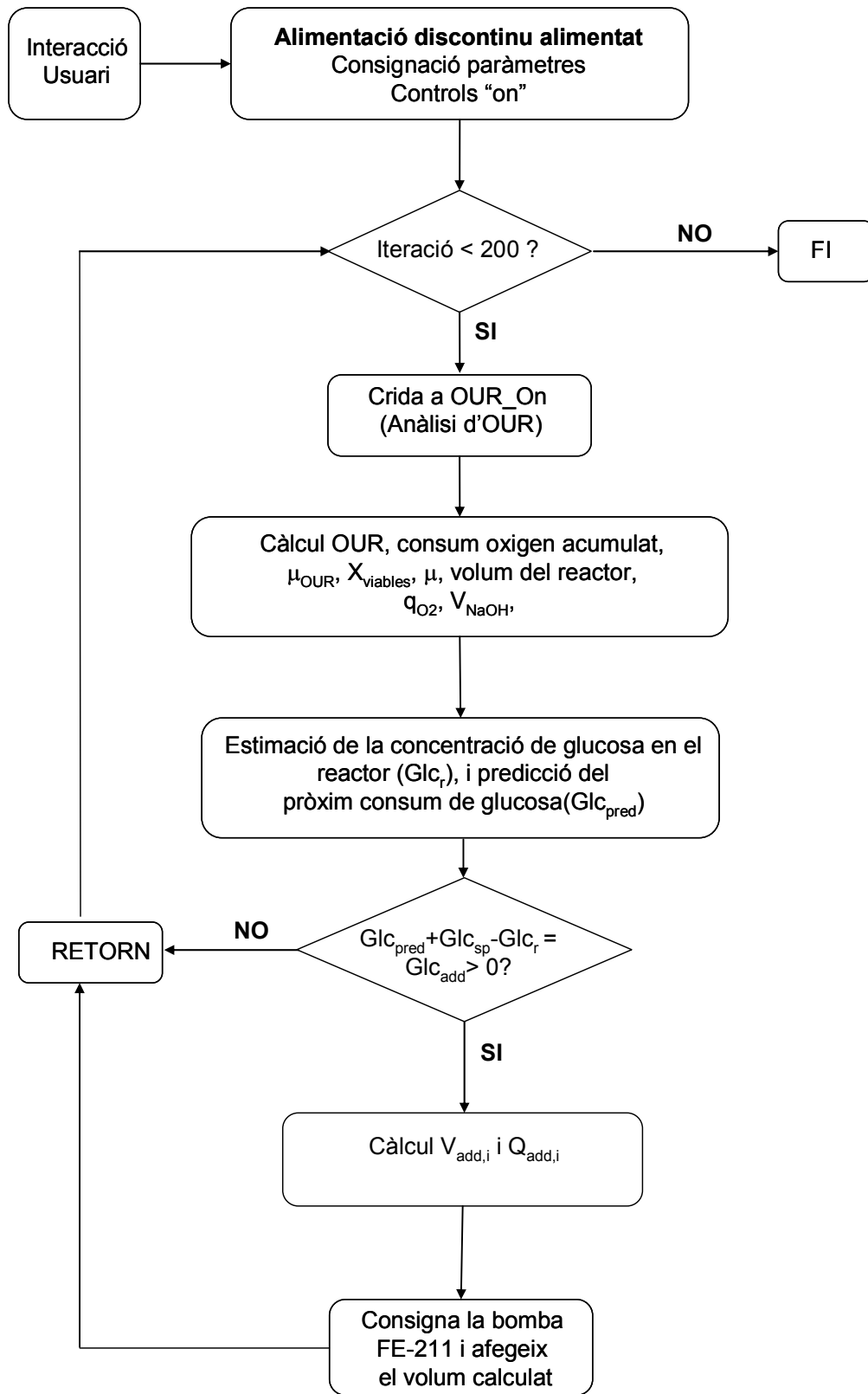


Figura 5-25: Diagrama de flux del programari de control de les addicions de medi per a un cultiu en discontinu alimentat, que es basa a partir de la mesura en línia de l'OUR.



Una vegada definida l'estratègia d'addició i determinats els paràmetres necessaris per a dur-la a terme, es planteja l'experiment en discontinu alimentat.

Les condicions del cultiu i el medi de partida són les mateixes que en el cas del discontinu, però en un volum de 1600 ml, i el medi que s'addiciona és IPL-41 amb glucosa com a única font de carboni i a una concentració dels seus components quatre vegades superior que en la formulació de partida (exceptuant el sèrum i aquells suplementes descrits com a no nutrients, gentamicina, plurònic i antiescumejant). A partir de l'estudi del cultiu en discontinu, es defineix el valor de l'OUR de 0,6 mmols/L·h com l'inici de les addicions del discontinu alimentat, ja que en aquest punt encara no es comença a observar el punt d'inflexió de la corba del perfil d'OUR, que seran incrementades a mesura que augmenti el valor d'OUR. Els perfils que s'han obtingut del discontinu alimentat es mostren a la Figura 5-26.

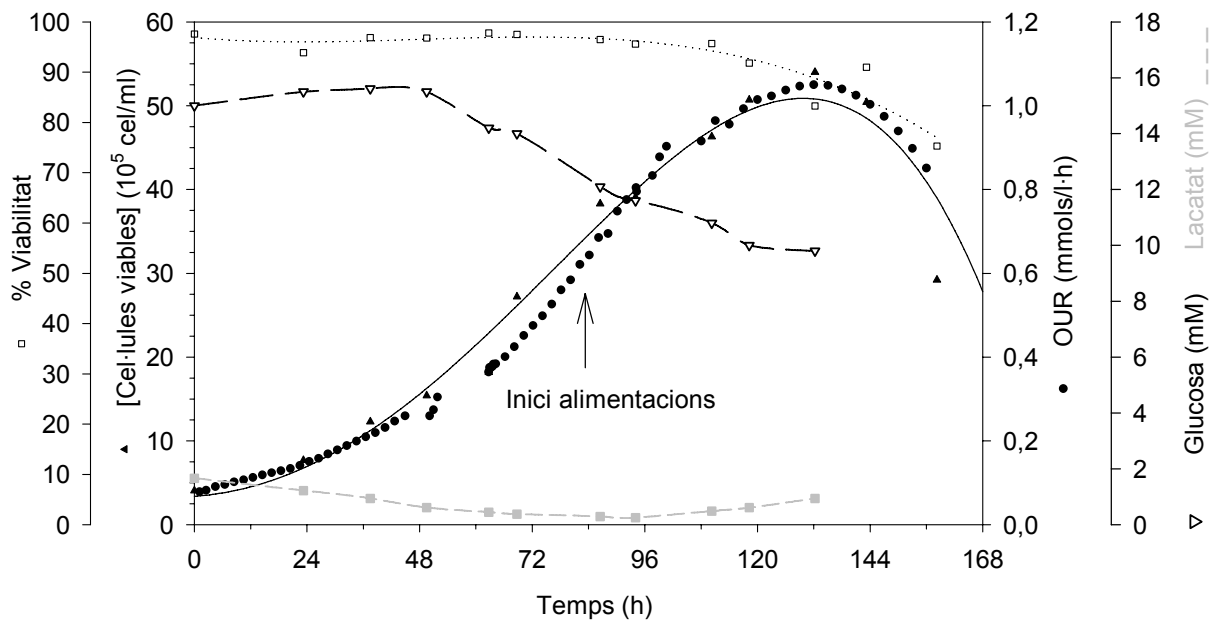


Figura 5-26: Perfils de concentració de cèl·lules viables (▲), OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□), concentració de glucosa (mM) (Δ) i de lactat (mM) (■) en un cultiu en discontinu alimentat en bioreactor amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS. La sageta indica l'inici de les alimentacions del medi concentrat amb la glucosa com a única font de carboni, i concentrat 4 vegades respecte l'original.

Observant el perfil d'OUR, no s'aprecien canvis notables respecte el discontinu (Figura 5-23), mantenint-se aproximadament l'inici de la fase de desacceleració del creixement cel·lular a les 96-100 hores de cultiu, tot i haver-se inicialitzat les addicions de medi fresc concentrat. També es conserva el moment del màxim del perfil d'OUR entre les 120 i les 140 hores de cultiu. L'única diferència que s'observa és que el valor de l'OUR en el seu punt

màxim és superior, però segons els valors que s'han obtingut del recompte cel·lular no es pot atribuir a un augment de la concentració cel·lular al sistema, sinó que sembla degut a una viabilitat més elevada (un 10% superior).

Així doncs, amb el resultat del discontinu alimentat es pot pensar en la hipòtesi de que el màxim de concentració de cel·lular no és conseqüència d'una limitació per l'exhauriment o degradació d'algun nutrient del medi, sinó que la limitació pot ser causada per una acumulació d'algun metabòlit o subproducte derivat de les rutes metabòliques de la soca de Sf9. Com es pot observar en el perfil de glucosa, en cap moment hi ha limitació de font de carboni, arribant a un valor mínim de 10 mM. No obstant, el tòxic no hauria de ser el lactat, ja que en cap cas s'observa que hi hagi una acumulació d'aquest subproducte.

#### **5.4.4. Cultiu en perfusió.**

Tot i que l'estratègia en discontinu alimentat es podria acabar de refinar intentant evitar l'acumulació de possibles compostos tòxics, però, degut a l'ampli ventall de candidats que poden ser els causants de la inhibició observada, a la dificultat de la seva identificació i a la complexitat dels anàlisis a realitzar, aquesta opció es desestima. Així doncs, s'opta per realitzar un tipus d'estratègia de cultiu que no requereix la identificació del subproducte tòxic, ja que aquest serà eliminat de manera continua del sistema, al emprar una estratègia de cultiu en perfusió.

El cabal d'addició en aquesta estratègia també es calcula a partir del valor d'OUR de manera similar a la metodologia emprada en el discontinu alimentat, amb la diferència que el medi que s'addiciona és el IPL-41 comercial corresponentment suplementat, sent l'addició continuada i no en polsos, com en el discontinu alimentat. De forma simultània, a mesura que es realitzen les addicions, un sensor de nivell detecta l'increment de volum al bioreactor, i s'acciona la bomba d'extracció del medi de cultiu exhaurit a través d'un mòdul d'ultrafiltració tangencial (mòdul de filtració de fibres buides), permetent la renovació del medi de cultiu, i retenint simultàniament les cèl·lules al bioreactor, assolint-se així cultius d'altres densitats cel·lulars (CADC) (Gàmez-2000). Aquesta característica ofereix una altra diferència respecte el discontinu alimentat, ja que el volum es manté constant al llarg de tot el bioprocés. De manera homòloga que en el cas del discontinu alimentat, l'addició de medi fresc s'incrementa a mesura que augmenta la densitat cel·lular, o el que és el mateix, a mesura que augmenta el valor de l'OUR. La Figura 5-27 mostra els perfils obtinguts en un cultiu en perfusió de la soca de Sf9, emprant igualment el medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de sèrum com a medi de

cultiu. Les condicions de cultiu són les mateixes que en les fermentacions anteriors en l'inici del cultiu, però al assolir una densitat cel·lular de  $7 \cdot 10^6$  cèl/ml, l'agitació s'augmenta fins a 80 rpm i el corrent d'aire s'enriqueix amb oxigen pur a través de l'estació de mescla de gasos, per tal de mantenir el nivell d'oxigen dissolt al voltant del 60% de saturació.

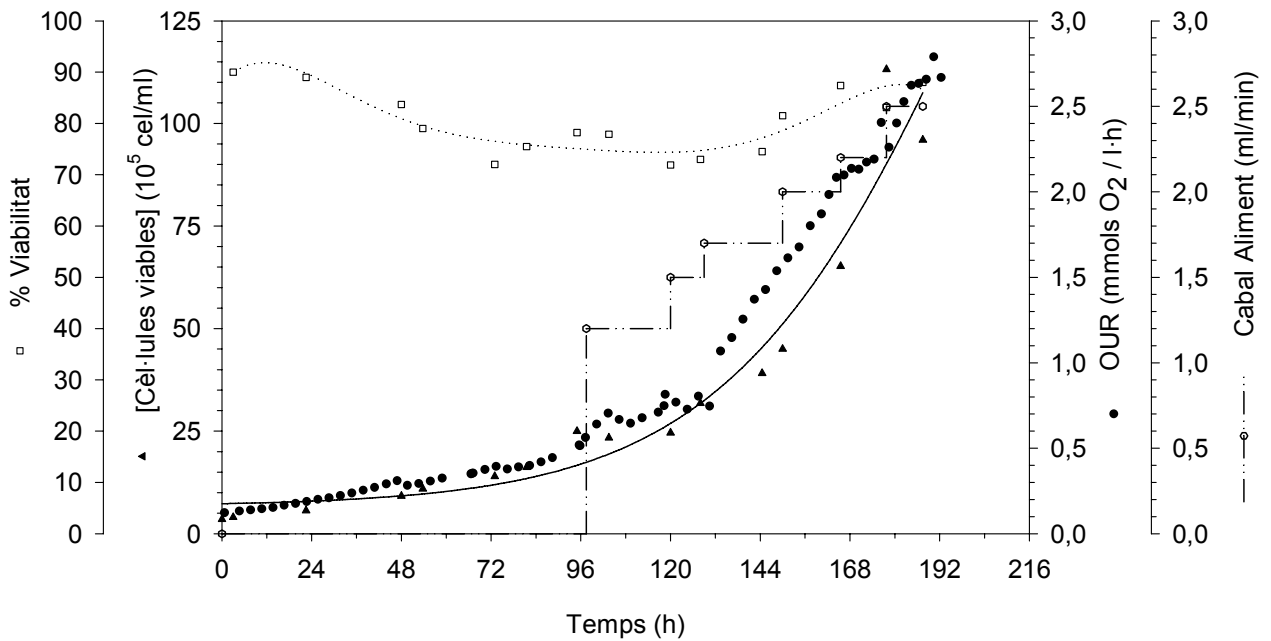


Figura 5-27: Perfil de cèl·lules viables (▲), OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□) i cabal d'aliment en un cultiu en perfusió en bioreactor emprant el medi IPL-41 suplementat amb Hidrolitzat de lactalbúmina, Extracte de Llevat i un 5% de FBS.

L'alimentació del medi de cultiu fresc s'inicia en el moment que l'OUR assoleix el valor de 0,6 mmols/L·h, que ha estat descrit com el moment d'inici de la limitació dels cultius anteriors.

El resultat que s'ha obtingut del cultiu en perfusió confirma les hipòtesis que s'han formulat anteriorment. Aquesta estratègia ha permès assolir cultius d'alta densitat cel·lular, arribant a concentracions superiors a  $10^7$  cèl/ml, més del doble del que s'obté en discontinu, augment que també s'observa en el valor de l'OUR que arriba fins a 2,5 mmols/L·h. Els resultats d'aquest experiment confirmen una vegada més que el seguiment del cultiu pot ser efectuat mitjançant la mesura d'OUR, com es desprèn dels perfils paral·lels entre el recompte cel·lular i d'OUR.

Si s'observa la corba de viabilitat, els seus valors són lleugerament inferiors als que s'havien observat en la resta de cultius, possiblement com a conseqüència del sistema de cultiu en el que hi ha presència d'un major estrès, per les condicions d'aeració i per la recirculació a través del mòdul de filtració tangencial. Per altra banda, quan s'opera en aquestes estratègies de cultiu, les velocitats específiques i els rendiments de consums varien al tractar-se de sistemes que es troben en condicions d'estrès, degut a la mètrica operacional i l'alta concentració de cèl·lules. En qualsevol cas, es confirma la hipòtesi de l'acumulació d'algun metabòlit tòxic en els anteriors sistemes (discontinu, discontinu fortificat i discontinu alimentat), ja que en aquest sistema de cultiu el metabòlit responsable de la inhibició pot ser retirat i no afecta al desenvolupament del cultiu.

Un cop conegudes les causes de les limitacions dels creixements dels cultius l'estratègia a desenvolupar per a poder assolir cultius d'alta densitat cel·lular, i per a poder decidir quina ha de ser l'estratègia més apropiada en aquest procés, s'ha d'avaluar l'efecte que tenen sobre la productivitat del producte d'interès, és a dir la proteïna (VP2) que expressa el baculovirus que ha d'infectar el cultiu cel·lular. En aquesta direcció s'enceta la següent secció del capítol, on es vol avaluar i quantificar la productivitat de les diferents possibles estratègies de cultiu, quedant descartades des d'un inici les opcions de discontinu alimentat, i discontinu fortificat.

## **5.5. Paràmetres claus, temps d'actuació: Definició i detecció en un procés infectiu.**

En la definició d'un procés d'infecció d'un cultiu cel·lular, en aquest cas de Sf9, per part d'un virus (en el present cas un baculovirus recombinant), cal definir una sèrie de punts importants en que cal prendre decisions encaminades a obtenir el millor rendiment del procés. Aquests paràmetres s'anomenen Temps d'Actuació (abreviat com a TOA, provinent de l'expressió "Time of Action").

Dins dels TOAs es defineixen diferents tipus d'actuacions que es poden dur a terme, com per exemple procedir a la infecció del cultiu, Moment d'infecció (TOI, Time of Infection), o el Moment d'Alimentació (TOF, Time of Feeding), o finalment el Moment d'Aturada o Recollida del producte ( TPI o TOH, Time Post Infection o Time of Harvest, respectivament segons l'origen temporal es referencii en l'inici de la infecció o del cultiu respectivament).

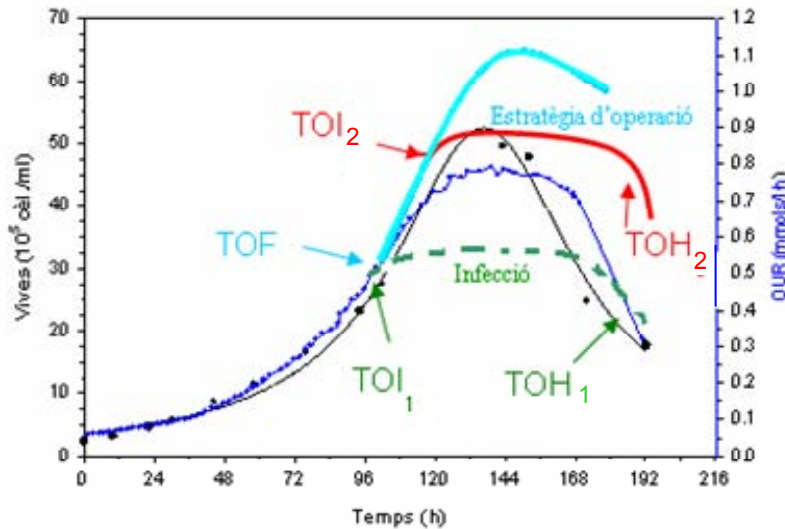


Figura 5-28: Representació i situació en un perfil d'un cultiu discontinu, i de les diferents possibilitats d'actuació que ofereix el sistema de monitoratge de l'OUR. Els primers moments d'actuació (TOA), corresponen a la detecció del final de creixement de la fase exponencial, en la que es pot iniciar una estratègia de cultiu (TOF) o procedir en la infecció (TOI), i finalment el temps d'aturada (TOH).

Un esquema de com es situen els diferents paràmetres d'actuació, i les diferents estratègies del procés que es poden dur a terme es mostren a la Figura 5-28. Dues possibilitats d'acció han estat representades sobre un perfil de creixement d'un cultiu en discontinu: la primera es basa en detectar el primer TOA en el que s'infecta el cultiu (TOI<sub>1</sub>) i després del cicle infectiu es recull el brou (TOH<sub>1</sub>), estratègia en discontinu (línia discontinua). L'altra opció consisteix en iniciar una estratègia d'alimentació per a assolir un cultiu d'alta densitat cel·lular (TOF), produint-se un altre TOA posterior, moment en que es procedeix a la infecció (TOI<sub>2</sub>), i finalment es recull el brou de cultiu (TOH<sub>2</sub>).

El desenvolupament d'un sistema d'automatització d'un procés productiu necessita poder detectar els diferents temps d'actuació de manera automàtica, en línia amb el procés i a partir de les dades registrades mitjançant el sistema de monitoratge a implementar

### 5.5.1. Detecció del moment d'infecció o d'alimentació.

En primer lloc es mostra el resultat d'un seguiment d'un cultiu de Sf9 per tal de revalidar el sistema de monitoratge a partir de la mesura de la velocitat de consum d'oxigen

OUR, i garantir que el monitoratge d'aquest tipus de processos sigui el màxim d'universal i fidel possible.

A la Figura 5-29 es presenta el resultat obtingut d'un cultiu en bioreactor Braun MD de 2 litres amb medi IPL-41, suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5 % de FBS, gentamicina (0.05 g/L), plurònic F- 68 (0,4%), antiescumejant C (50ppm). El cultiu es desenvolupa en amb una agitació de 60 rpm, una temperatura de 28 °C, i un pH de 6,2. L'inòcul és de  $2,5 \cdot 10^5$  cèl/mL.

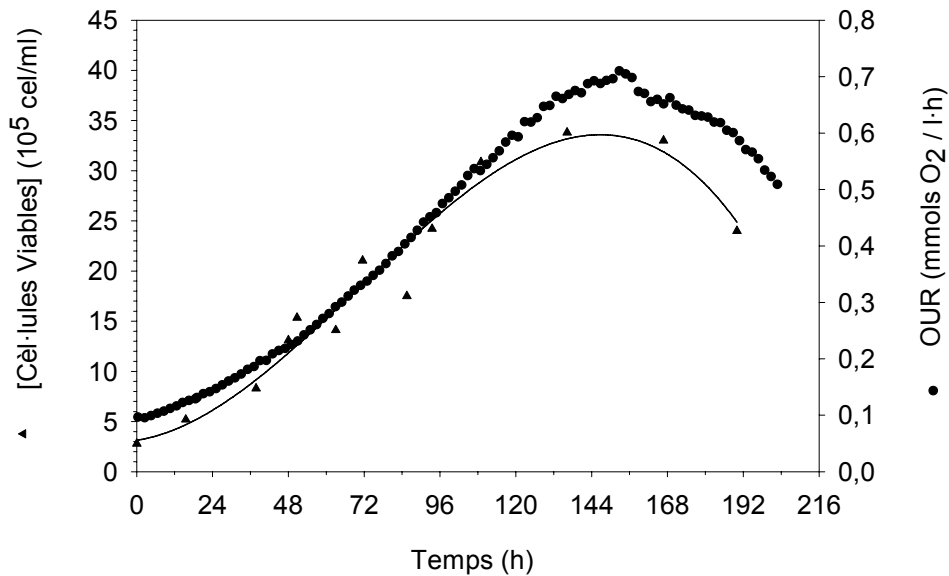


Figura 5-29: Perfils de creixement cel·lular(▲) i de la mesura en línia d'OUR (●) en un cultiu en discontinu en bioreactor de 2 litres en medi IPL-41 amb suplement i un 5% de sèrum de Sf9 sense infectar.

En aquest cas s'observa que el desenvolupament del cultiu amb medi IPL-41 suplementat és perfectament seguit per la corba descrita pel perfil d'OUR. La concentració d'inòcul és propera a  $3 \cdot 10^5$  cèl/mL, al que li correspon un valor d'OUR de 0,1 mmols/L·h. El màxim de concentració cel·lular es situa a  $3,2 \cdot 10^6$  cèl/mL, que correspon a 0,7 mmols/L·h, i s'obté entre les 144 i 168 hores de cultiu). Si s'observen els perfils de la concentració cel·lular i d'OUR, el perfil d'OUR està lleugerament desplaçat temporalment respecte al de la concentració cel·lular recomptada per tinció amb blau de tripà. Aquest fet mostra com el seguiment de la concentració cel·lular és més precís emprant el monitoratge de l'OUR que no el recompte, ja que al iniciar-se la fase de mort, la paret cel·lular es debilita i permet ser penetrada per colorant sent recomptada la cèl·lula com a no viable, però en realitat encara és activa fisiològicament. Per aquest motiu s'observa aquest retard de la caiguda del perfil d'OUR respecte el perfil de concentració cel·lular.

El Temps d'Actuació (TOA) que es defineix pot ser, o bé el Moment d'Infecció (TOI), o el Moment d'Alimentació (TOF). Segons les característiques de les corbes de concentració de cèl·lules viables en cultius cel·lulars, un cop s'inicia la fase de mort produïda per alguna limitació o inhibició, la viabilitat d'aquests decau ràpidament i un cop iniciada aquesta fase resulta difícil recuperar el cultiu encara que hi hagi addició de nutrients frescs. Aquesta característica dels cultius de les cèl·lules animals, il·lustra la gran importància de la detecció en línia de l'inici de la fase de desacceleració del creixement exponencial, ja que permetria actuar o bé per addicionar nutrients al medi i iniciar una estratègia de cultiu en búsqueda de cultius d'alta densitat cel·lular, o bé procedir a la infecció del cultiu, si es pot garantir la presència de suficients substrats en el medi.

De les dades obtingudes del recompte cel·lular fora de línia, i de la mesura en línia d'OUR d'un cultiu en discontinu en bioreactor, es planteja el balanç de concentració cel·lular i el seu respectiu homòleg a partir de les dades d'OUR, tal i com es mostra en les següents equacions. En un discontinu, els termes entrada i sortida són nuls, només resten els termes acumulació i generació:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Equació 5-16}$$

$$\frac{dOUR}{dt} = k_{dh} \cdot OUR \quad \text{Equació 5-17}$$

Com es pot observar en les equacions, el terme de velocitat específica de creixement de l'organisme ( $\mu$ ), quan el balanç es planteja per la variable OUR en comptes de la concentració cel·lular, s'anomena  $k_{dh}$  ( $h^{-1}$ ), que correspon a la velocitat específica de creixement basada en l'augment del consum d'oxigen.

Si s'integren els balanços obtinguts emprant com a límits d'integració l'inici i la fi de la fase de creixement exponencial, fase en que no hi ha cap tipus de limitació de creixement i la velocitat de creixement és màxima i constant, les expressions dels balanços una vegada integrades es poden representar-se com:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m \cdot t \quad \text{Equació 5-18}$$

$$\ln OUR = \ln OUR_0 + k_{dh} \cdot t \quad \text{Equació 5-19}$$

Així doncs, mentre el cultiu es trobi en fase exponencial la representació del  $\ln$  OUR en front del temps serà una funció lineal, i la pèrdua de linealitat vindrà regida per l'inici

d'alguna limitació en el cultiu, i es podrà observar l'inici de la fase de desacceleració de la velocitat de creixement. La detecció del moment en què els valors d'OUR que s'estiguin obtenint, o millor dit, els seus respectius valors del Ln OUR, difereixin del valor de la projecció de la recta teòrica calculada en cada cas en la fase exponencial (mantenint com a criteri un valor de desviació  $\epsilon$  determinat), marcarà el primer TOA, ja sigui TOI o TOH. La Figura 5-30 mostra el perfil del cultiu anterior del Ln OUR, per tal de corroborar la precisió que s'obté en aquesta aproximació.

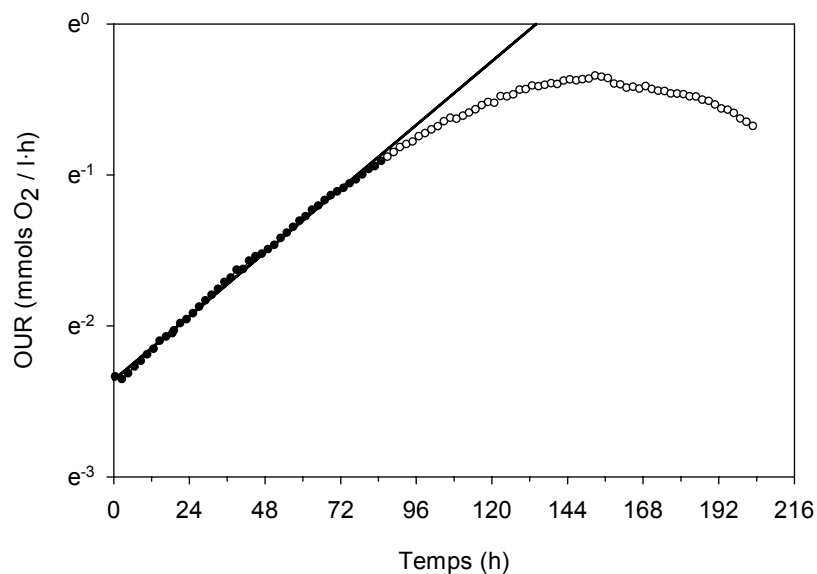


Figura 5-30: Representació del Ln OUR en front del temps. Durant la fase de creixement exponencial la relació entre les dues variables és lineal (●), mentre que al final de l'etapa exponencial el valor del Ln OUR (○) divergeix de la linealitat i la seva velocitat de variació disminueix progressivament, tot i que el seu valor augmenti.

Observant la figura es confirma l'anàlisi que es dedueix de les equacions dels balanços. En el cultiu s'observa una primera fase lineal del Ln OUR, que correspon a la fase de creixement exponencial, fase en que tant la velocitat específica de creixement ( $\mu$ ) com la velocitat específica de creixement basada en l'augment de consum d'oxigen ( $K_{dh}$ ), prenen els seus valors màxims i es mantenen constants. En el moment en que s'inicia el canvi del valor de la velocitat de creixement, s'observa com el valor del Ln OUR difereix del comportament lineal que seguia quan el creixement és desenvolupa a velocitat constant. Per tant, la diferència entre el valor del Ln OUR i el valor de la projecció temporal del comportament teòric en la fase de creixement exponencial augmenta, podent emprar-se en un futur aquest criteri per a detectar el TOA.



Per tal abans d'afirmar de manera completa que aquest Temps d'Actuació (TOA) detectat en línia és apte per a ser definit com a Moment d'Infecció (TOI), cal estudiar detingudament el cicle infectiu dels baculovirus, per a poder garantir la presència de substrats suficients per a la replicació vírica i l'expressió de la proteïna VP2, abans no s'iniciï la fase de mort del cultiu.

## **El cicle infectiu dels baculovirus.**

El cultiu in vitro de cèl·lules d'insecte amb infecció mitjançant baculovirus és força complexa, degut a la interacció que s'ha de produir entre els dos sistemes biològics, com ja s'ha observat en l'anterior Capítol. La capacitat del baculovirus de replicar-se, obtenint un elevat títol en la soca concreta, determinarà en gran part el nivell de proteïna recombinant produïda (Maruniak·1996).

El medi de cultiu no tan sols juga un paper important en el creixement de les cèl·lules, sinó que també té un fort efecte en l'expressió de la proteïna per part del baculovirus. És per aquest motiu que cada medi ha de ser optimitzat per a cada línia cel·lular, i per a cada tipus de virus (Maruniak·1996). Altres factors que afecten el creixement cel·lular com el pH, el nivell d'oxigen dissolt, etc. són factors que també determinen la quantitat de proteïna expressada.

L'expressió dels gens del baculovirus està dividida en tres etapes diferents, que es mostren conjuntament amb l'evolució de la concentració de virus alliberats a la Figura 5-33.

### **Fase primerenca:**

Aquesta primera fase té lloc aproximadament entre les 0-6 hores post-infecció, i precedeix la replicació del DNA viral, s'expressen un seguit de gens primerencs, la funció dels quals és activar la transcripció d'altres gens (Guarino i Summers·1986).

### **Fase de transició:**

Aquesta segona fase (aproximadament de les 6 a les 18 hores), es caracteritza per l'extensa replicació del DNA víric i la formació de la progènie del virions individuals (BV). També compren la producció de proteïnes estructurals de les nucleocàpsides, i les proteïnes nuclears (Wilson *i col.*·1987). Aquests virions individuals són els responsables de produir les infeccions secundàries, és a dir que a partir de la seva generació, els BV són capaços de reinfectar les cèl·lules dels teixits o dels cultius sanes (que no havien estat infectades des de l'inici)(Miller·1997). Una altra proteïna que es produeix de manera abundant en aquesta etapa,

és una glicoproteïna estructural que forma les envoltes dels BV, però no dels ODV (virions oclusionats en l'envolta de polihedrina), que té com a funció identificar el receptor de superfície per a l'entrada dels virions BV a l'interior de la cèl·lula (Volkman·1986).

### Fase tardana:

La fase tardana està compresa entre les 20 i les 70 hores post infecció, i està caracteritzada per l'abundant transcripció de polihedrina, que passa a formar part de l'envolta d'oclusió (ODV) en cas dels baculovirus nadius, mentre que en els recombinants es produeix la proteïna d'interès al substituir-se per la polihedrina. La polihedrina esdevé la proteïna que predomina en la cèl·lula, arribant a representar entre un 25-30 % del total de proteïna sintetitzada (Faulkner i Carstens·1986).

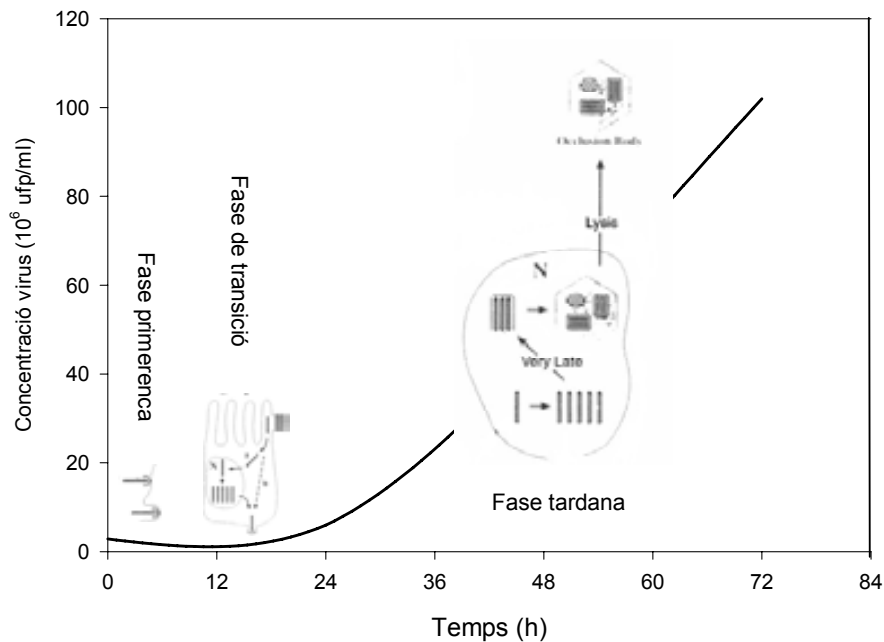


Figura 5-31: Representació de l'evolució de la concentració de virus en suspensió al brou de cultiu, on s'especifica la fase de la replicació en que es troba el baculovirus, des de l'entrada dels virions a la cèl·lula, la replicació del DNA i finalment, una vegada finalitzat el cicle, l'alliberació dels virus al brou de cultiu.

En les primeres fases del cicle d'infecció, moment en que els virus penetren en les cèl·lules, la concentració de virus en suspensió pateix una davallada, i no comença a augmentar fins a les 24 hores, el que correspon a la fase tardana on s'expressa la polihedrina (en els baculovirus no recombinants) o la proteïna heteròloga (en els baculovirus recombinants), la formació de les envoltes i l'alliberació dels virus al brou de cultiu. Així doncs, el sistema de detecció del TOI ha de garantir un període de temps després de la infecció en el qual hi hagi nutrients al medi per tal de que la síntesis de la proteïna no es vegi limitada, i

aquest període ha de ser com a mínim de la durada que té la fase tardana del cicle viral, entre 20-70 hores. No obstant, la cinètica de cadascuna de les fases del procés infectiu també es pot veure afectada per la MOI (Multiplicitat d'Infecció) que s'hagi utilitzat. Per tant, per tal de definir més concretament el sistema, s'ha d'estudiar l'efecte de la MOI sobre la durada de les fases infectives en cada cas concret.

### **Efecte de la Multiplicitat d'Infecció (MOI) sobre el cicle infectiu del baculovirus.**

Com s'ha comentat anteriorment, un dels paràmetres a estudiar en l'etapa d'infecció és la denominada MOI, multiplicitat d'infecció, és a dir, el nombre de virus que s'utilitza per cèl·lula receptora en el cultiu. La MOI és un paràmetre clau que pot influir directament en la productivitat específica de la proteïna d'interès.

Es procedeix doncs a realitzar una sèrie d'experiments en els que s'estudiarà l'efecte de tres valors de MOI diferents: 0.5, 1 i 2, els resultats dels quals es mostren a la Figura 5-32. El cultiu de Sf9 es desenvolupa en medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de sèrum, i es duu a terme en flascons agitats de 250 ml amb un volum de 50 ml a 60 rpm, a l'interior d'un incubador a 28 °C i 95% d'humitat. L'inòcul dels cultius és per tots els casos de  $1.2 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. Aquesta concentració cel·lular concreta s'utilitza per a garantir que el procés d'infecció i replicació vírica es dugui a terme sense limitacions de substrats ni d'aeració en el medi de cultiu.

El seguiment de la concentració dels virus en suspensió de l'experiment es realitza mitjançant la titulació de virus per recompte d'unitats formadores de partícules (veure el capítol de Materials i Mètodes). La quantitat de virus produïts en un cultiu en principi és normalment proporcional a la quantitat de proteïna final.

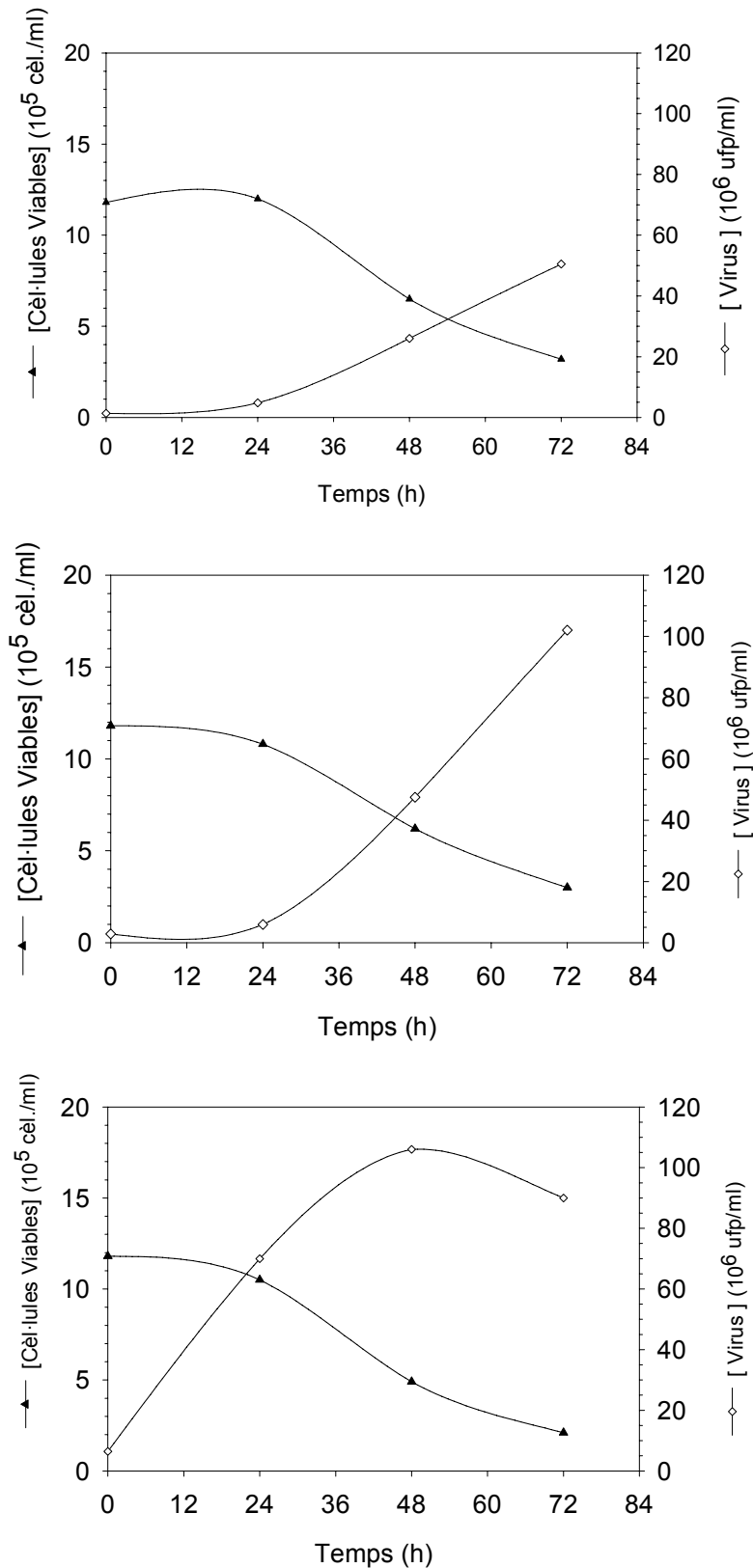


Figura 5-32: Perfils de les evolucions de les concentracions de cèl·lules viables (▲) i de virus en suspensió (◇) dels cultius de Sf9 infectats amb el baculovirus recombinant AcVP2.IBDV a MOI de 0,5, 1 i 2 (de dalt a baix respectivament). Experiments realitzats en flascons agitats amb medi IPL-41 suplementat i amb 5% de FBS.

Si es comparen els diferents perfils obtinguts per cadascun dels casos estudiats, s'observa que a partir de la infecció, la concentració de cèl·lules viables es manté

aproximadament constant en els estadis inicials, i el posterior descens del perfil de la concentració de cèl·lules viables és més pronunciat a mesura que es desenvolupa el cicle infectiu.

Els perfils de concentració vírica resulten força diferents segons la MOI utilitzada. A mesura que augmenta la MOI, l'aparició de virus en el brou de cultiu és més ràpida, arribant al màxim de concentració a les 48 hores en el cas de MOI de 2. En canvi aquests perfils es mostren més suaus per els experiments de MOIs més baixes, on el màxim de concentració vírica s'assoleix a les 72 hores.

La titulació màxima de virus obtinguda és de  $50 \cdot 10^6$  ufp/mL (Unitats Formadores de Partícules),  $105 \cdot 10^6$  ufp/mL i  $100 \cdot 10^6$  ufp/mL per MOIs 0.5, 1 i 2 respectivament. El perfil de concentració de virus en el cas de MOI de 2, assoleix el valor màxim de concentració vírica a les 48 hores després de la infecció, mentre que en altres casos el màxim s'assoleix a les 72 hores. A la Figura 5-33 es mostra en un diagrama de barres la concentració de virus es suspensió per cadascun dels casos de l'experiment anterior.

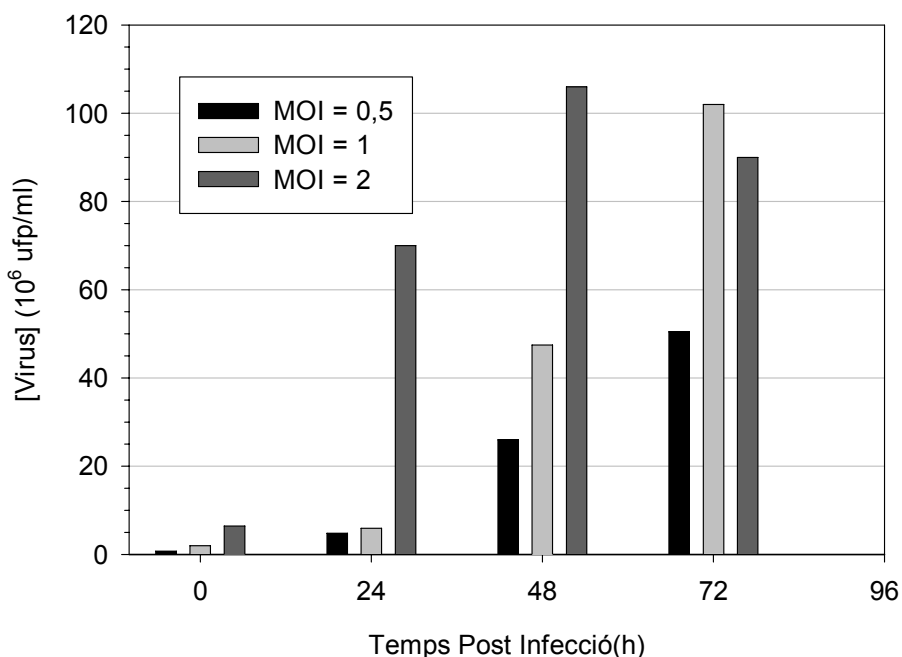


Figura 5-33: Avaluació de la concentració de baculovirus en suspensió, en cultius de Sf9 infectats amb el baculovirus recombinant AcVP2.IBDV en medi IPL-41 suplementat i emprant flascons agitats com a sistema de cultiu. Les MOI estudiades són de 0.5, 1 i 2, i la titulació s'ha realitzat per recompte de partícules.

Observant els temps en que la titulació vírica és màxima, i per tant en el sistema productiu s'hauria de recollir el brou abans de l'alliberació del virus, s'obtenen uns valors de 48 hores en el cas en que la MOI tingui un valor de 2 i de 72 hores en el cas de les MOIs de 0,5 i 1. Si s'extrapola aquest interval de temps a la Figura 5-30 s'observa que la linealitat de la fase exponencial es perd cap a les 80-90 hores del cultiu, i el màxim d'OUR (o densitat cel·lular) es situa cap a les 140-150 hores. Durant aquest interval de 60-70 hores, tot i que el cultiu ha disminuït la velocitat de creixement, les cèl·lules continuen dividint-se i augmentant la concentració, fet que assegura que hi ha prou presència de substrats disponibles en el medi que permeten sintetitzar els productes de la biosíntesi per a la generació cel·lular. Partint de la base que l'expressió i síntesi d'una proteïna i la replicació vírica ha de menester menys quantitat de recursos, es pot assumir des d'un principi que durant aquest període entre la detecció del TOI i l'esgotament dels recursos hi haurà prou nutrients en el medi per tal que la síntesi del candidat vacunal no es vegi limitada.

No obstant, per a reduir els volums a tractar en la fase de purificació del candidat vacunal en un bioprocés productiu, resulta interessant poder aturar i recollir el brou de cultiu abans que es produeixi la lisi cel·lular al final del procés infectiu, i purificar la VP2 intracel·lular. Aquesta metodologia permet reduir el volum total de brou de purificació, una vegada recuperades les cèl·lules, procedir a la seva lisi, i separar els restes cel·lulars del sobrenedant. Per tant, aquest experiment ha de permetre avaluar el temps en que el baculovirus lisa la cèl·lula, i s'allibera al brou de cultiu, en funció de la MOI. Aquest paràmetre, combinat amb la informació del cicle infectiu i replicatiu del baculovirus descrit anteriorment, hauran de permetre avaluar i detallar la metodologia de detecció del moment d'aturada i recol·lecció del brou de cultiu (TPI o TOH) en línia.

### **Validació del sistema de detecció del TOI en bioreactor i monitoratge de la fase infectiva.**

La detecció del Moment d'Infecció (TOI) ha de garantir que l'eficiència de la producció de la proteïna d'interès sigui elevada, i per aquest motiu ha de considerar dos aspectes bàsics: el primer consisteix en infectar la màxima concentració de cèl·lules possible, i el segon que durant el període que dura la infecció s'ha d'assegurar que no hi haurà una limitació de recursos al cultiu de manera que pugui disminuir la productivitat de la proteïna.

El sistema clàssic per a definir el TOI es basa en prefixar un valor de concentració cel·lular situat a la meitat de la concentració màxima que pot assolir un sistema, i es detecta mitjançant el recopmt de cèl·lules viables (Kamen *i col.*·1996b), realitzant-se a partir del valor fixat i mesurat fora de línia. No obstant, aquesta metodologia no està optimitzada i és poc adaptable a les característiques particulars de cadascun dels processos.

Amb tots aquests aspectes desenvolupats fins al moment, es planteja realitzar nous experiments per tal de validar experimentalment la metodologia en línia de la detecció del TOI proposada. Per aquest motiu es plantegen dos cultius en bioreactor emprant medi IPL-41 suplementat, que seran infectats utilitzant la metodologia de detecció en línia del TOI a partir del monitoratge de l'OUR. La diferència entre els dos cultius recau sobre la MOI a utilitzar: es vol comprovar el sistema en un rang de MOI superior a 1 (MOI de 1,5), i una MOI inferior a 1, (MOI de 0,05).

Per evitar que alguna pertorbació en el moment de la mesura de l'OUR pogués donar un valor erroni i es donés el cas d'una falsa detecció del TOI, s'incorpora una mesura de seguretat que consisteix en establir un comptador (n), que suma la quantitat de mesures consecutives en que hi ha hagut desviació del valor del Ln OUR. S'estableix com a TOI, el moment en que  $n=5$ , és a dir a la cinquena mesura consecutiva que s'hagi desviat del valor projectat. Per altra banda, si només és un valor el que s'ha desviat del valor lineal esperat, i els valors posteriors retornen al valor de la tendència anterior, el comptador es reinicialitza. Aquest fet comporta que el marge entre la detecció del TOI i l'esgotament dels substrats disminueixi unes 7,5 hores, ja que l'OUR en CADC avançats es mesura cada 1,5 hores en el sistema que s'ha desenvolupat en el present treball. Aquesta esdevé una finestra de temps que es considera prou bona, sobretot quan es compara amb el sistema clàssic de detecció del TOI a partir de mesures fora de línia.

En primer lloc s'estudia el desenvolupament d'un cultiu infectat emprant una MOI de 1,5 partícules infectives/cèl·lula, en un cultiu desenvolupat amb medi IPL-41 amb suplement, un 5% FBS i la resta d'additius habituals. Els valors i els perfils obtinguts del cultiu es mostren en la Figura 5-34.

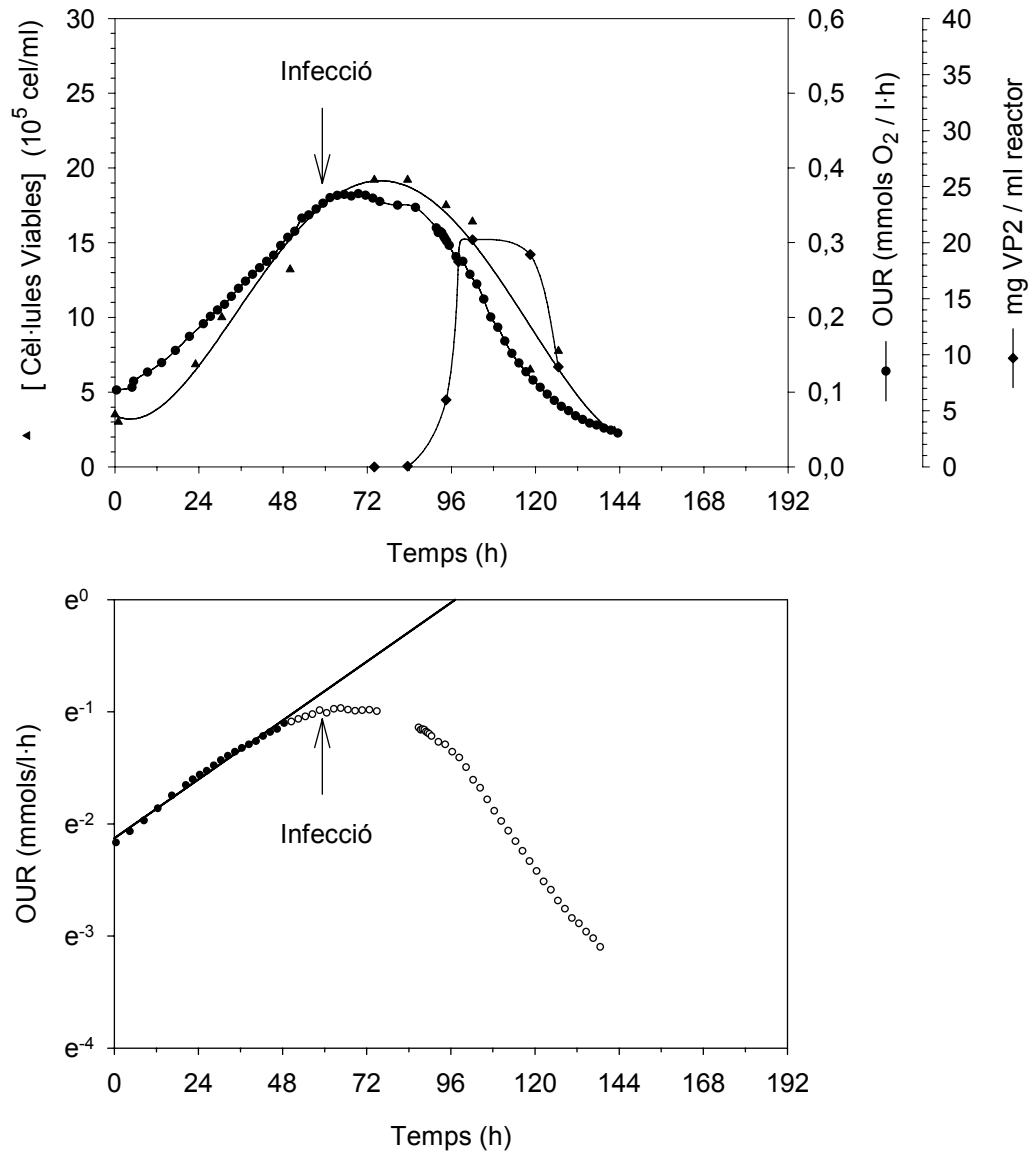


Figura 5-34: Perfils obtinguts del cultiu de Sf9 en discontinu infectat amb el baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI=1,5 i amb la detecció automàtica del TOI. Part superior: Perfils de creixement cel·lular(▲), de la mesura en línia d'OUR (●) i de la concentració intracel·lular de VP2 (◆) respecte el temps. Part inferior: Representació del Ln OUR en front del temps. El càlcul en línia de la desviació entre la corba d'OUR i de la recta que es projecta a partir de linealització de la fase exponencial (○) permet determinar en línia el moment òptim per a la infecció (TOI)

La fase inicial del cultiu presenta un aspecte similar a la resta de cultius realitzats, partint d'un inòcul de  $3 \cdot 10^5$  cèl/ml, sense que es detecti la presència de una fase de latència destacable. El cultiu creix correctament en al fase exponencial, tal i com es mostra en la linealització del valor del Ln OUR, fins que arriba a una concentració cel·lular de  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml que correspon a un temps de 55 hores, moment en que es comença a perdre la



linealitat del perfil de Ln OUR. Després de la detecció de 5 punts consecutius de desviació, cap a les 62 hores (TOI), el cultiu és infectat amb una MOI de 1,5.

Emprant valors de MOI superiors a 1, es d'esperar que el cultiu sigui infectat totalment, fet que es pot deduir observant el perfil de concentració de cèl·lules viables un cop el cultiu ha estat infectat, que es manté a una concentració aproximadament constant. El virus, al penetrar a la cèl·lula, utilitza tots els mecanismes de producció de metabòlits i precursors de síntesi del cèl·lula receptora per a replicar-se, i no permet que es destinin recursos a la divisió cel·lular, observant-se així una estabilització tant del valor de cèl·lules viables com el valor d'OUR.

El perfil de la concentració de VP2 intracel·lular produïda, té valors propers a zero en les fases inicials de la infecció (fase primerenca i de transició del cicle infectiu) ja que encara no es sintetitza la proteïna d'interès. Cap a les 20 hores comença a augmentar el seu valor fins arribar a un màxim de 22 µg/mL unes 40 hores després d'haver-se produït la infecció.

A continuació es realitza l'experiment en que es prova una MOI = 0.05 en un cultiu en discontinu (Figura 5-35), per tant es tracta d'una MOI inferior a 1 i conseqüentment en el moment que es detecti el TOI i s'infecti el cultiu, només s'infectarà un baix percentatge de cèl·lules (com a màxim un 5%).

El cultiu és inoculat a una densitat de  $3,5 \cdot 10^5$  cèl/mL, i en aquest cas s'observa una petita fase de latència, que queda reflectida en la part inferior de la figura, on el valor de l'OUR no és lineal fins unes 12 hores després. Després d'aquesta primera fase el cultiu creix a velocitat màxima constant fins a una concentració de  $3 \cdot 10^6$  cèl/mL, moment en que es perd la linealitat del seguiment del Ln OUR, cap a les 75 hores. Amb el sistema de detecció en línia s'obté un valor del TOI de 82 hores, moment en que es procedeix a la infecció del cultiu.

Un cop infectat el cultiu, s'observa com el perfil de concentració de cèl·lules viables encara continua augmentant, fet que es pot entendre degut a que una infecció amb una MOI de 0,05 no infecta totalment el cultiu, únicament el 5 %, per tant un 95% de les cèl·lules continua dividint-se.

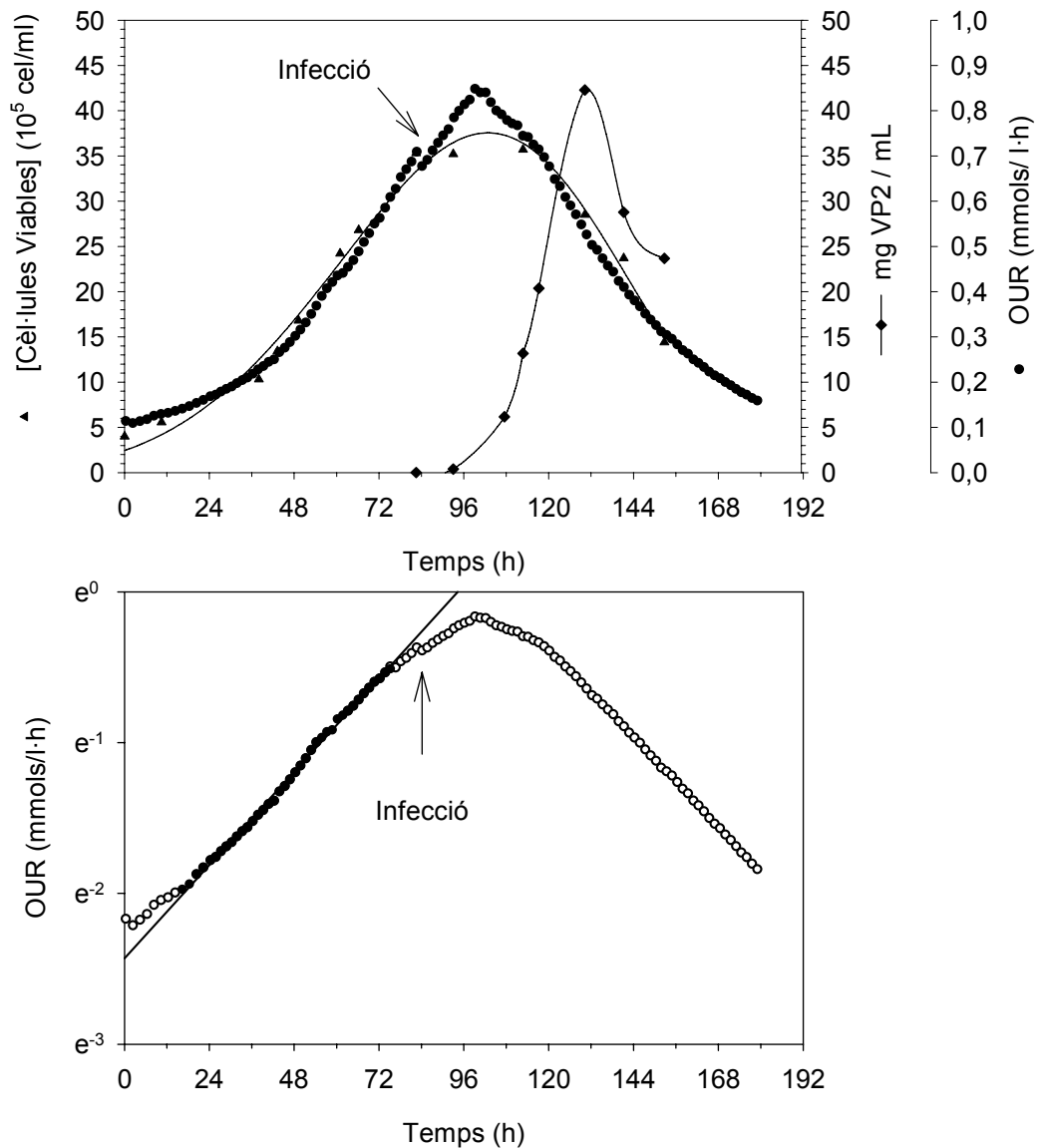


Figura 5-35: Perfils obtinguts del cultiu de Sf9 en discontinu infectat amb el baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI=0,05 i amb la detecció automàtica del TOI. Part superior: Perfils de creixement cel·lular( $\blacktriangle$ ), de la mesura en línia d'OUR ( $\bullet$ ) i de la concentració intracel·lular de VP2 ( $\blacklozenge$ ) respecte el temps. Part inferior: Representació del Ln OUR en front del temps. El càlcul en línia de la desviació entre la corba d'OUR i de la recta que es projecta a partir de linealització de la fase exponencial ( $\circ$ ) permet determinar en línia el moment òptim per a la infecció (TOI)

Per una altra banda, el perfil de proteïna intracel·lular produïda difereix del que s'havia observat en el cas de MOI=1,5. L'aparició de la proteïna pateix un retràs d'unes poques hores, i l'augment de la concentració de VP2 és més sostingut amb el temps, assolint un màxim de 43  $\mu\text{g/mL}$  a les 50-55 hores després de la infecció. El retard de l'aparició del màxim de proteïna intracel·lular podria ser degut a una reinfecció del cultiu a partir virus produïts en la

primera infecció i que hagin estat alliberats en el medi. Aquest increment del valor de la VP2 intracel·lular no s'ha d'entendre en termes absoluts d'expressió, ja que pot ser deguda a la diferència de la cinètica de lisi cel·lular dels dos cultius, mostrant aquest segon una major homogeneïtat en la sincronització del procés infectiu, mentre que en el primer, part de la proteïna expressada podria haver estat alliberada al medi de cultiu. Per una altra banda, si es calcula el valor de velocitat específica de producció de la proteïna d'interès ( $0,28 \mu\text{g}/10^6 \text{cel}\cdot\text{h}$  i  $0,32 \mu\text{g}/10^6 \text{cel}\cdot\text{h}$ , per MOIs de 1,5 i 0,05 respectivament), no s'observa una variació molt significativa.

La informació de l'estat fisiològic del cultiu que ens aporta la mesura d'OUR, també resulta interessant per a analitzar el comportament del perfil durant la fase infectiva. En alguns estudis previs que han estat publicats, alguns autors descriuen que el valor de l'OUR augmenta durant les primeres fases del cultiu (Reuveny *i col.*·1993; Scott *i col.*·1992). Aquest fet el relacionen amb diferents causes: en primer lloc per l'increment de la demanda d'energia per a dur a terme el procés de síntesi de proteïnes, la replicació del DNA i de l'alliberació del material genètic del virus de les càpsides que el protegeixen (Kamen *i col.*·1996a). El procés de síntesi de proteïnes ha estat típicament descrit com una de les vies de biosíntesis amb més demanda d'energia en la majoria d'organismes (Lehninger·1975). Aquest increment de la demanda d'oxigen descrit coincideix en l'etapa on té lloc la major quantitat de síntesi de DNA i la major replicació vírica (TK Wong *i col.*·1994). No obstant, en altres treballs no s'ha observat cap increment del valor de l'OUR posteriorment a la infecció del cultiu (King *i col.*·1992; Schopf *i col.*·1990).

Tenint en compte els antecedents bibliogràfics es poden interpretar les evolucions dels perfils d'OUR en els experiments efectuats degut a la MOI que s'ha emprat en cada cas. S'observa que en el cas de infecció amb una MOI de 1,5 (Figura 5-34) el valor de l'OUR es manté constant després de la infecció, degut a l'eficiència infectiva que no deixa que el cultiu continuï dividint-se, produint-se una aturada de la divisió cel·lular, com es pot observar en el perfil de concentració cel·lular. Posteriorment, i després d'unes 30 hores ambdós perfils comencen a davallar suaument. En canvi, quan la infecció es desenvolupa a una MOI baixa, el període que segueix la infecció mostra un creixement tant del perfil de concentració cel·lular com d'OUR (Figura 5-35), degut a que només un 5% de les cèl·lules han estat infectades en el moment inicial i conseqüentment resulta imperceptible l'aturada de la divisió cel·lular.

Per tant, l'ús de la mesura en línia d'OUR aporta informació sobre l'estat del cultiu durant el procés d'infecció, mostrant-se així com una bona eina per a determinar el TOI i realitzar el seguiment de la fase infectiva.

Com ja s'ha explicat anteriorment, el sistema de detecció del TOI necessita de la definició a priori del valor de desviació de la mesura del Ln OUR experimental respecte la projecció en el temps del valor de la recta que defineix la linealització de la fase de creixement exponencial, que s'anomena  $\epsilon$ . Inicialment s'ha pres com a referent per la seva quantificació ( $\epsilon=0,05$ ) l'experiment mostrat a la Figura 5-30 (cultiu en discontinu no infectat). No obstant, és necessari recomprovar que el criteri emprat per a definir la desviació del comportament lineal del balanç linealitzat de la fase exponencial i el valor real del Ln OUR, que havia estat definit com a  $\epsilon=0,05$ , és vàlid per a tots els cultius realitzats. Per això es realitza l'anàlisi dels valors experimentals en la fase de creixement exponencial, calculant la desviació ( $\sigma$ ) entre el valor del Ln OUR i la projecció de la recta en el temps determinat, tal com es mostra en la següent equació:

$$\sigma = \text{Abs}(\text{Ln}(\text{OUR}_{\text{exp}}(t)) - (a \cdot t + b)_{\text{linealització}}) \quad \text{Equació 5-20}$$

Amb els resultats de l'estudi estadístic, es construeix la Taula 5-3 en la que es recull els resultats obtinguts d'aquest estudi en els tres cultius en discontinu realitzats. Com es pot comprovar no hi ha cap valor situat en la fase exponencial en cap dels tres experiments realitzats que es desviï més d'un 0,05 del valor de la projecció de la recta provinent del balanç, per tant es pot considerar com a bo el valor definit anteriorment.

	Discontinu no infectat (Figura 5-29)	Discontinu infectat MOI=1,5 (Figura 5-34)	Discontinu infectat MOI=0,05 (Figura 5-35)
$\sigma_{\text{max}}$	0,043	0,043	0,047
$\sigma_{\text{min}}$	$7,4 \cdot 10^{-5}$	0,0039	0,0022
$\sigma_{\text{mitja}}$	0,015	0,026	0,018

Taula 5-3: Taula recull dels anàlisis estadístics de les desviacions de la linealització del balanç d'OUR en discontinu i les mesures reals, per a validar el valor de desviació emprat com a criteri,  $\epsilon$ .

Per completar el monitoratge d'un procés infectiu, resta analitzar, definir i detectar el moment en que s'ha de recollir i processar el producte, és a dir, el moment d'aturada del procés (TPI o TOH).

A més, un últim aspecte que es vol corroborar de la metodologia proposada per a la detecció del TOI és la no existència de limitació de substrats en el medi durant la fase d'infecció i d'expressió de la proteïna d'interès. A la Figura 5-34 i Figura 5-35, es pot avaluar el TPI, com el temps que ha transcorregut des del moment d'infecció fins al màxim de la concentració de VP2 intracel·lular. Aquests valors són respectivament de 40 i 50-55 hores, per les MOIs de 1,5 i 0,05 respectivament. En ambdós casos aquest valor està dins del marge que s'ha pogut avaluar de la Figura 5-29, entre el moment de detecció de la pèrdua de linealitat del valor del Ln OUR i el màxim de densitat cel·lular o d'OUR, que correspon a un temps d'unes 60-70 hores. Els valors obtinguts de TPI se'ls hi pot afegir un marge de 7,5-10 hores, que correspon al temps necessari per a detectar de manera segura (arribar a  $n=5$ , 5 valors consecutius fora de la linealitat) el TOI, i encara resten situats dins del marge en que s'ha definit que no hi ha limitació de substrats. Aquest fet estaria en concordança amb els valors similars de velocitat específica de producció de la proteïna, reafirmant-se així la hipòtesi de que no hi ha una limitació de substrats al medi. A continuació, és pretén explorar una metodologia que permeti detectar en línia el TPI o TOH, utilitzant si és possible el mateix sistema de mesura en línia de l'OUR.

### **5.5.2. Detecció del moment d'aturada o recollida del cultiu.**

El TOH o el TPI pot ser definit segons diferents condicions o estat del cultiu. Si el producte d'interès és el virus, hom ha d'esperar a una completa lisi del cultiu, i purificar els virus del brou, garantint la màxima productivitat, mentre que si el producte és una proteïna (com en el nostre cas, la VP2), resulta més efectiu purificar la proteïna intracel·lular. El fet de que la proteïna no sigui alliberada al medi, redueix molt els volums de purificació i elimina les restes de proteïnes provinents del sèrum que dificultin la purificació disminuint els rendiments. Per tant, el sistema de monitoratge ha de ser capaç de detectar el moment en que comença la lisi del cultiu, o equivalentment el moment en que la concentració de la proteïna intracel·lular sigui màxima.

Una anàlisi acurada dels perfils de la mesura d'OUR en els dos cultius duts a terme a diferents MOI, sembla mostrar que coincideix a nivell temporal el màxim de proteïna VP2 intracel·lular, amb el segon punt d'inflexió del perfil d'OUR, concretament en al zona posterior al màxim del perfil, quan el seu valor disminueix. És possible relacionar aquest punt d'inflexió de la corba d'OUR en el moment en que les cèl·lules estan a punt de ser lisades de forma majoritària, alterant-se la tendència del perfil de disminució del valor d'OUR. Per tant, si es pogués posar a punt una metodologia de detecció d'aquest punt d'inflexió, es podria aturar el

procés en el moment en que hi ha màxima concentració intercel·lular de VP2, just abans de que es produeixi la lisi de forma massiva al cultiu.

Com que a nivell de tractament matemàtic de dades i funcions resulta més senzill trobar el zero d'una funció, es proposa treballar amb les derivades segones per a localitzar i detectar el TOH, que correspondria al punt d'inflexió de la funció. La primera aproximació es presenta en la Figura 5-36, on es presenta els perfils dels valors de la derivada  $dOUR/dt$  i de la derivada segona  $d^2OUR/d^2t$ , que han estat calculats de manera analítica, és a dir per cadascuna de les noves mesures que aporta el sistema de monitoratge.

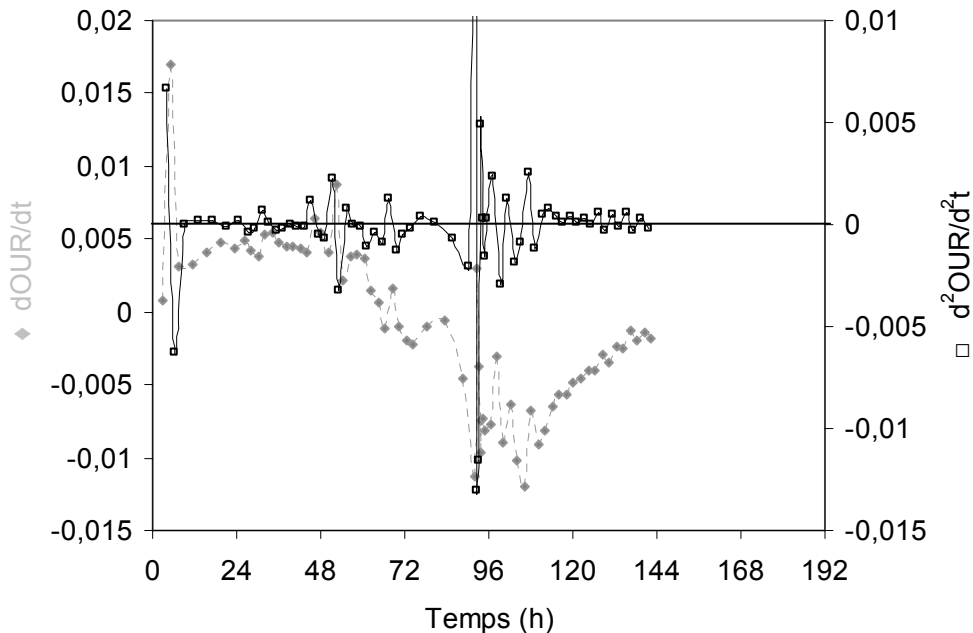


Figura 5-36: Evolució del perfil de les derivades 1a i 2a del valor d'OUR calculades de manera analítica a partir dels valors del cultiu representat en la Figura 5-34. Cultiu en bioreactor infectat amb baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI de 1,5.

Com es pot observar a la Figura 5-36, aquesta metodologia és massa sensible al soroll, i propaga l'error intrínsec a la mesura. Una de les opcions per a corregir aquest soroll, desviació i propagació de la mesura d'OUR al efectuar les derivades és la implementació d'un filtre que descarti aquelles mesures desviades. No obstant, això fa disminuir molt el nombre de mesures, i a més resulta complicat d'implementar a nivell de programari per a l'automatització del procés.

Una alternativa per a poder treballar en base a les derivades evitant el soroll i la sensibilitat a que estan sotmesos aquest tipus de càlculs, consisteix en treballar en base a funcions que aproximïn els perfils que s'obtenen. Si s'observa el perfil del Ln OUR en els diferents cultius desenvolupats, es pot deduir que el perfil correspon a una paràbola amb el màxim o mínim poc pronunciat, perfil típic d'una polinomi de 4<sup>art</sup> ordre. El fet de treballar sobre el Ln OUR en comptes de sobre els valors directes de l'OUR és degut a que al aplicar el logaritme neperià es suavitzen el perfil de les branques de la paràbola, atenuant el perfil sigmoïdal que presenta els valors de l'OUR. Inicialment s'avaluen els ajustos de polinomis de diferents graus, i el que millor ajust presenta en els diferents casos és el de 4art grau. Una vegada es parametriza la funció polinomial, ja es pot treballar analíticament amb ella per a descriure els perfils de les derivades primera i segona de l'OUR.

Així doncs l'equació del polinomi ajustat resulta:

$$\text{LnOUR} = at^4 + bt^3 + ct^2 + dt + e \quad \text{Equació 5-21}$$

Expressant l'equació en funció de la variable OUR directament:

$$\text{OUR} = \exp(at^4 + bt^3 + ct^2 + dt + e) \quad \text{Equació 5-22}$$

Equació a la que ja se li pot aplicar la derivada primera i posteriorment derivant la primera per a obtenir la derivada segona resultant les següents expressions:

$$\frac{d\text{OUR}}{dt} = \exp(at^4 + bt^3 + ct^2 + dt + e) \cdot (4at^3 + 3bt^2 + 2ct + d) \quad \text{Equació 5-23}$$

$$\frac{d^2\text{OUR}}{d^2t} = \exp(at^4 + bt^3 + ct^2 + dt + e) \cdot (4at^3 + 3bt^2 + 2ct + d)^2 + \exp(at^4 + bt^3 + ct^2 + dt + e) \cdot (12at^2 + 6bt + 2c)$$

Equació 5-24

Reorganitzant l'expressió anterior i igualant-la a zero, s'obté:

$$\frac{d^2\text{OUR}}{d^2t} = 0 = (4at^3 + 3bt^2 + 2ct + d)^2 + (12at^2 + 6bt + 2c) = 4at^3 + (12a + 3b)t^2 + (2c + 6b)t + 2c + d = 0$$

Equació 5-25

A la Figura 5-37 es mostra el perfil del Ln OUR calculat a partir de les dades que han estat obtingudes dels dos cultius en bioreactor presentats en la Figura 5-34 i la Figura 5-35 (part superior i part inferior respectivament), i els seus respectius ajustos a polinomis de 4rt grau.

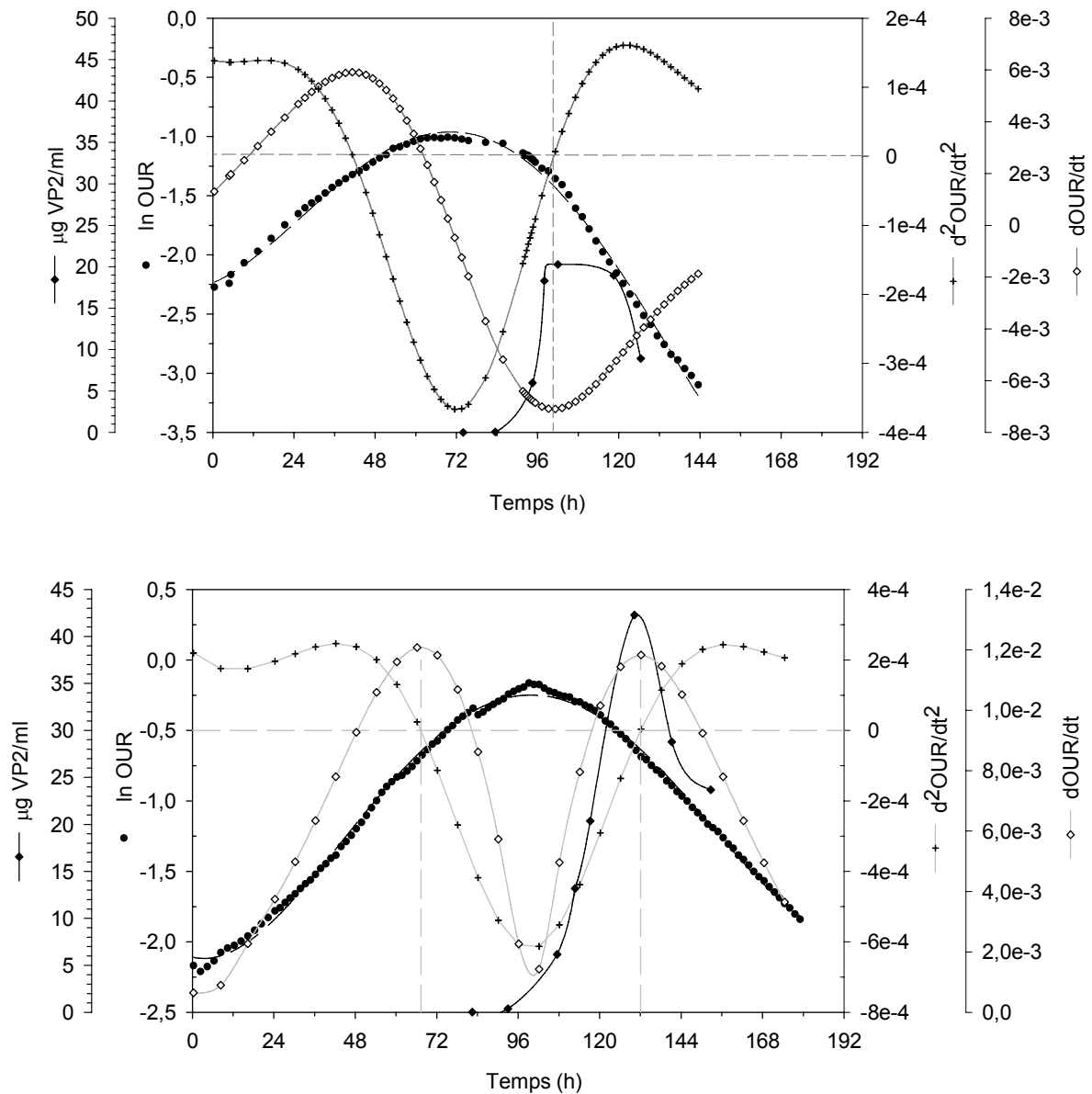


Figura 5-37: Perfils de Ln OUR ( $\bullet$ ) i el corresponent ajust a un polinomi de 4<sup>rt</sup> grau ( $-$ ), perfil de la primera derivada del perfil d'OUR ( $\diamond$ ), i de la segona ( $+$ ), i de la concentració intracel·lular de VP2 ( $\blacklozenge$ ). Cultius en discontinu de cèl·lules Sf9 infectats amb baculovirus recombinant AcVP2.IBDV emprant una MOI de 1,5 (part superior) i una MOI de 0,05 (part inferior).



A partir de l'equació que s'obté d'ajustar els polinomis a les dades obtingudes, mostrats de forma genèrica a l'equació 1-7, es generen les funcions derivada primera i derivada segona. El fet de treballar sobre les equacions analítiques, on el soroll ja ha estat esmorteït per l'ajust del polinomi de 4rt grau del Ln OUR, fa que desapareixi la problemàtica de la hipersensibilitat que s'ha vist de les derivades numèriques.

Retornant a la hipòtesi de que el TOH es pot relacionar amb el punt d'inflexió que mostra el perfil d'OUR, aquesta pot ser corroborada observant el perfil de la derivada primera (que descriu un mínim en la seva funció), o bé observant que el valor de la derivada segona esdevé zero, coincideix plenament en els dos casos amb el màxim de la concentració de la proteïna intracel·lular.

El TOH, o el punt d'inflexió del perfil d'OUR, correspon al valor més petit (pel fet de ser negatiu) del pendent del perfil, que vist des del punt de vista bioquímic pot ser explicat per ser el moment en que comença un procés sever de lisi cel·lular i la conseqüent alliberació del virus al brou de cultiu. Després d'aquest punt, i degut a que es continua duent a terme el procés de lisi, s'observa un descens del valor de la proteïna intracel·lular, que passa a estar en solució. Per aquest motiu és important poder detectar el TOH amb una certa anticipació, ja que un retard en la seva detecció pot comportar pèrdues importants de producte. La robustesa del mètode emprat i el gran nombre de dades sobre les que es treballa, comporta que coneguts els valors que conformen del màxim del perfil de l'OUR, la variació del polinomi que s'ajusta sobre el seu perfil a mesura que es registren més dades és mínima, permetent predir amb una anticipació de 24 hores i amb exactitud el TOH. Aquesta característica és el que fa que aquesta metodologia pugui ser implementada en sistemes automatitzats amb garanties, ja que la detecció no es dóna en temps real sinó de manera anticipada.

### **5.5.3. Proposta d'automatització del bioprocés.**

La detecció dels diferents temps d'actuació que han estat descrits i analitzats en les seccions anteriors del capítol es pot integrar en una proposta d'automatització del procés que es mostra en la Figura 5-38 (Lecina *i col.*:2006).

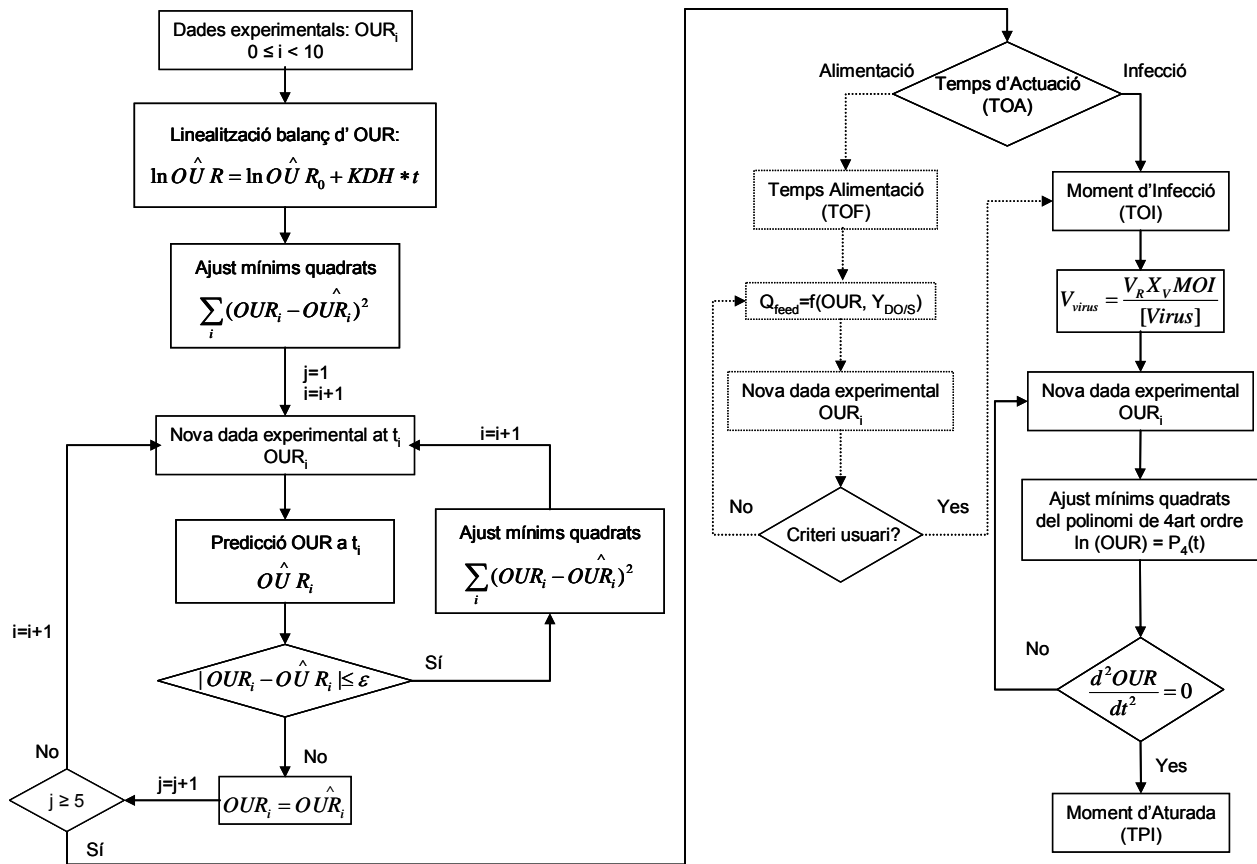


Figura 5-38: Proposta d'esquema de procés i control per a un sistema de cultiu de cèl·lules d'insecte-baculovirus. L'esquema mostra les diferents opcions d'accions proposades emprant el monitoratge de l'OUR. La branca situada a l'esquerra mostra la detecció del TOA associat a la disminució de la velocitat de creixement del cultiu, la branca central mostra la proposta de control d'addició per a estratègies d'alta densitat (TOF) i la branca situada a la dreta representa la proposta per a la infecció (TOI) i la recollida del producte (TOH).

El procés està basat en el monitoratge de l'OUR i considera les mesures que es van acumulant al llarg del desenvolupament del cultiu. Un cop iniciat el cultiu i obtinguts els 10 primers valors d'OUR, ja es pot procedir a l'ajust de la recta provinent de la linealització del balanç de la concentració cel·lular per ajust de mínims quadrats. A partir d'aquest moment (prèvia validació de l'usuari), cada nova mesura es compara amb el valor en el temps  $i$  del valor projectat que s'obtidria de la recta. Si aquest no difereix més d'un  $\epsilon=0,05$ , és acceptat i es recalcula de nou la recta. Si el valor en canvi no està dins del rang, s'inicialitza el comptador de desviació. La mesura presa a continuació pot tornar a situar-se dins del rang, fet que indicaria que ha estat una oscil·lació puntual de la mesura i el comptador s'inicialitzaria de nou. En canvi, si la mesura continua desviant-se, al acumular-se 5 valors consecutius, es considera que s'ha detectat el primer TOA, que pot ser emprat per a inicialitzar una estratègia d'alta

densitat cel·lular (que pot utilitzar el valor de l'OUR i el rendiment oxigen-substrat per a calcular l'addició de nutrients), o bé es procedeix a la infecció (TOI), calculant la quantitat d'inòcul víric necessari per a realitzar la infecció (coneixent la concentració vírica de l'inòcul, el volum del reactor, i la  $q_{O_2}$ ).

Una vegada realitzada la infecció, es continua prenent les mesures d'OUR per a la detecció del TOH o TPI, aproximant un polinomi de 4<sup>art</sup> grau a les mesures de Ln OUR, i calculant el moment en que la seva derivada segona esdevé nul·la. Aleshores es dona per finalitzat el cultiu i es recull el brou de cultiu, que pot ser processat i purificat.

## **5.6. Infecció de cultius amb estratègies d'alta densitat cel·lular.**

En l'apartat 5.4 s'han estudiat les diferents possibles estratègies de cultiu per a poder assolir altes densitats cel·lulars, i s'ha descartat la possibilitat de treballar en discontinu fortificat i en discontinu alimentat, ja que no aportaven cap millora respecte el discontinu. La única estratègia que ha donat bon resultat ha estat la perfusió, i manca explorar les possibilitats d'infectar amb el baculovirus recombinant el cultiu per a poder avaluar la viabilitat d'aquest tipus de procés.

Per a poder procedir a la infecció d'un cultiu en perfusió s'ha de considerar les característiques de funcionament d'aquest, i les seves limitacions. El sistema de cultiu en perfusió emprat utilitza un mòdul d'ultrafiltració tangencial que permet retenir la concentració cel·lular en el reactor i extreure el medi esgotat. Aquest sistema, degut a l'elevada concentració cel·lular, presenta un consum de substrats considerable, la concentració dels quals davallaria ràpidament al aturar l'alimentació, podent provocar una alteració irreversible del cultiu. Per altra banda, la mida del porus del cartutx de fibres buides (mòdul d'ultrafiltració tangencial) és de 0,22  $\mu\text{m}$ , suficient per a poder retenir les cèl·lules animals en el seu interior, però insuficient per a retenir les partícules virals per la petita mida que caracteritza els virus. Per tant, una infecció del cultiu en perfusió comportaria la pèrdua del virus a través del mòdul d'ultrafiltració, reduint l'eficiència productiva. A partir d'aquesta característica es considera la possibilitat d'emprar un sistema de dues etapes per a treballar en infeccions en cultius d'alta densitat.

El primer cas d'estudi consisteix en un sistema de reactors on el primer desenvolupa la funció de producció de cèl·lules operant en perfusió, i en el moment que s'assoleix una concentració cel·lular de  $10^7$  cèl·l/mL, s'efectua una descarrega de la meitat del volum del brou en el segon reactor, en el que se li addiciona medi fresc i l'inòcul víric, de manera que es pot realitzar una infecció en discontinu però d'alta densitat, tal com es mostra en l'esquema de la Figura 5-39. Les condicions de cultiu (medi, condicions d'operació,...) són les mateixes que en els cultius anteriors realitzats en bioreactor, exceptuant l'estratègia de cultiu.

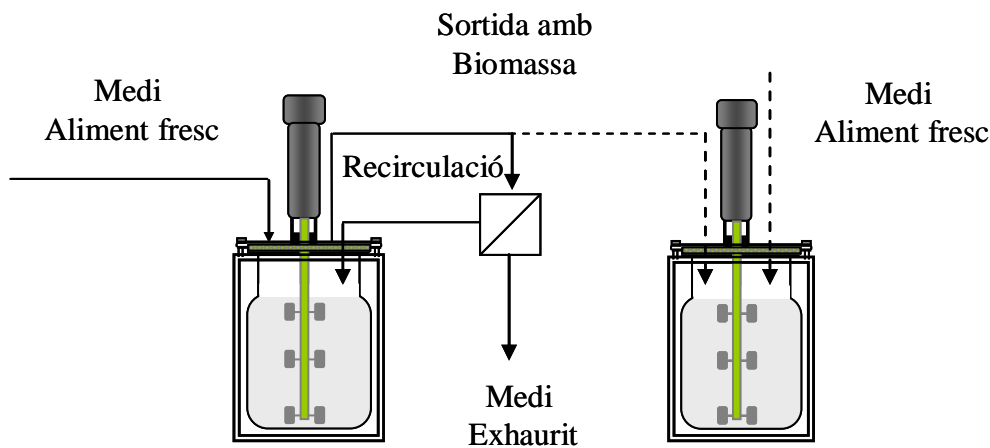


Figura 5-39: Esquema d'un sistema de reactors en sèrie en que la primera etapa opera en una estratègia en perfusió fins a altes densitats cel·lulars. Després d'aquesta primera etapa s'alimenta el segon reactor on s'addiciona medi fresc i es produeix la infecció amb baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI de 1. El segon reactor treballa en discontinu, per tant les descarregues són cícliques.

El cultiu es desenvolupa amb medi IPL-41 suplementat i amb un 5% de sèrum. Les condicions de cultiu són: temperatura 28 °C, pH de 6,2, i inicialment s'agita a 60 rpm i s'augmenta la velocitat d'agitació a 80 rpm al assolir una densitat cel·lular de  $7 \cdot 10^6$  cèl·l/mL, moment en que el corrent d'aire s'enriqueix amb oxigen pur a través de l'estació de mescla de gasos. Els perfils de les dues etapes es mostren en la Figura 5-40 i Figura 5-41.

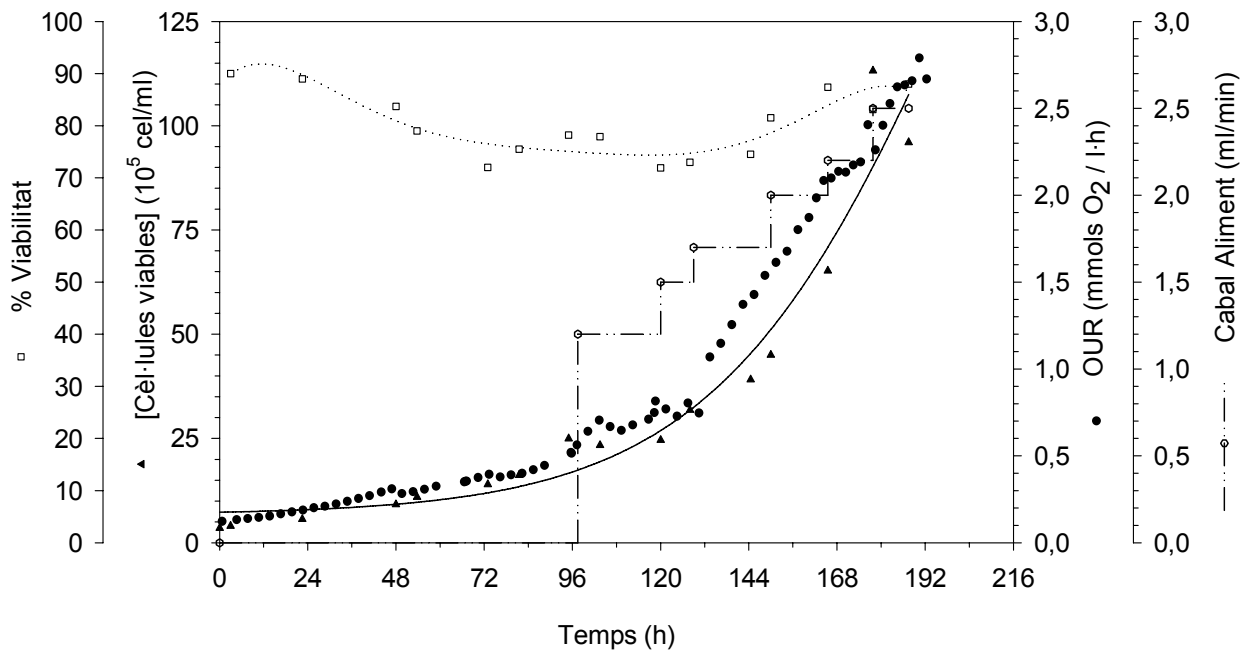


Figura 5-40: Cultiu de Sf9 en perfusió amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS, pertanyent a la primera etapa del sistema de dos reactors. Perfils de creixement cel·lular (▲), de la mesura en línia d'OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□) i cabal d'aliment (○).

Aquesta primera etapa del sistema de reactors en sèrie correspon a la perfusió mostrada anteriorment. A les 96 hores de cultiu i amb una concentració cel·lular de  $2,5 \cdot 10^6$  cèl·l/ml, s'inicia l'alimentació d'aliment fresc i la retirada a través del cartutx de filtració tangencial del brou esgotat. El cabal d'aliment inicialment és de 1,1 ml/min, i s'augmenta fins a 2,5 ml/min quan s'assoleix una concentració de  $10^7$  cèl·l/ml. Els perfils de la primera etapa mostren que després d'unes 180 hores de cultiu la concentració cel·lular supera els 10 milions de cèl·lules per mil·lilitre, moment en que es transvasa la meitat del volum del bioreactor a la segona etapa, on s'afegeix 800 ml de medi IPL-41 suplementat fresc i 170 ml d'inòcul víric que representa una MOI aproximada de 1 virus/cèl·lula. S'escull una MOI propera a 1 per a forçar que la infecció sigui total i que el cicle infectiu sigui més ràpid. Amb l'addició del medi fresc s'ha de garantir l'aportació suficient de nutrients i substrats que no limiti el cicle infectiu i per tant l'expressió de la VP2.

Una vegada es transvasa el brou de cultiu amb les cèl·lules al segon bioreactor i s'hi addiciona el medi fresc, aquest opera com un discontinu i les condicions del cultiu es mantenen igual que en els cassos de cultius anteriors. Els perfils que s'obtenen de la segona etapa es mostren a la Figura 5-41.

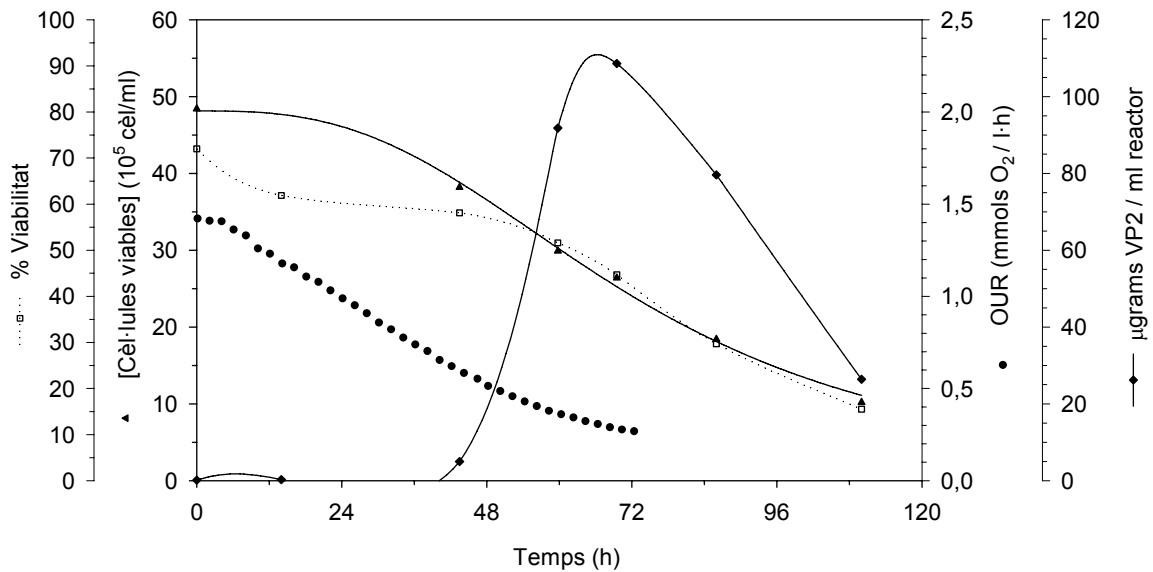


Figura 5-41: Perfil de cèl·lules viables (▲), OUR (●), % de viabilitat cel·lular (□) i concentració de VP2 (◆) de l'etapa discontinua infectada amb baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI de 1, en un sistema de dues etapes.

En aquest sistema no té sentit la detecció del TOI, ja que l'etapa de perfusió es sostenible consignat correctament el valor del cabal d'alimentació, i en la segona etapa la infecció es realitza des d'un inici del cultiu.

Els perfils obtinguts mostren com des del moment en que hi ha la infecció, aquesta es produeix de manera efectiva, ja que la concentració cel·lular no augmenta en els primers estadis (que es el que s'esperaria si no hi hagués hagut una bona infecció). El perfil de concentració cel·lular comença a disminuir de manera més ràpida a partir de les 48 hores post infecció. El perfil de VP2 intracel·lular assoleix el seu màxim a les 60 hores postinfecció, i el seu valor és de 110 μg/mL de reactor, que en comparació amb els resultats obtinguts en discontinu, és superior al doble. Aquest fet és degut a que gairebé també es doble la concentració cel·lular disponible per a ser infectada.

Aquesta estratègia permet recuperar de nou el cultiu de la primera etapa, la perfusió, de manera que assoleix de nou la concentració cel·lular, podent-se procedir a l'alimentació amb noves cèl·lules per a realitzar un nou cicle d'infecció en discontinu.

El segon cas a estudiar consisteix també en un sistema de dos reactors on el primer es destina a la producció de cèl·lules operant en perfusió (igual que en el cas anterior), però l'alimentació des de la primera etapa fins a la segona és contínua, tal i com es mostra en la Figura 5-42 i Figura 5-43.

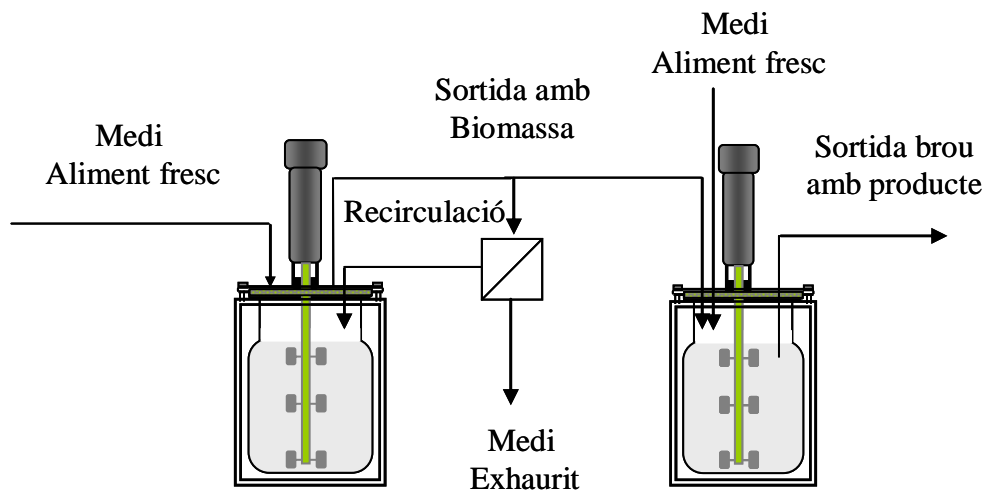


Figura 5-42: Esquema d'un sistema de reactors en sèrie en que la primera etapa opera en una estratègia en perfusió fins a altes densitats cel·lulars. Després d'aquesta primera etapa s'alimenta el segon reactor on s'addiciona medi fresc i es produeix la infecció amb baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI de 1. El segon reactor treballa en continu.

El corrent que alimenta la segona etapa on es duu a terme la infecció prové del sistema en perfusió, on s'han exhaurit gairebé tots els nutrients del medi, de manera que s'addiciona al segon bioreactor un corrent d'alimentació en continu de medi fresc. Un cop realitzada la infecció, de la segona etapa en surt un corrent continu de producte, que haurà de ser processat i la proteïna purificada.



Figura 5-43: Fotografia de el cultiu en dues etapes en continu. El bioreactor de la dreta treballa en perfusió i altes densitats cel·lulars, amb la missió d'abastir de cèl·lules el bioreactor situat a l'esquerra, que treballa en continu i on es procedeix a realitzar la infecció amb el baculovirus.

La Figura 5-44 (part superior) mostra els perfils de la primera etapa del procés, on hi ha la producció de cèl·lules. Es pot observar les diferents etapes del procés, iniciant-se per una etapa en discontinu (comuna a totes les estratègies de cultiu) que dura unes 72 hores, moment en que s'inicia el cultiu en perfusió. En els primers estadis de la perfusió s'observa un creixement exponencial, indicant una bona arrancada del procés. L'alimentació a la segona etapa es produeix en el moment en que s'assoleix una densitat cel·lular de  $9 \cdot 10^6$  cèl/ml, cap a les 120 hores de cultiu. Inicialment el cabal de transferència de la primera etapa a la segona és d'aproximadament 2 ml/min, transformant el cultiu en perfusió a un cultiu que opera en continu, fet que es reflexa en la baixada de concentració cel·lular en el primer bioreactor tot i la inèrcia de creixement que hi ha. Aquest cabal es manté fins que el volum en el segon bioreactor assoleix els 1000 ml, moment en que es reprèn el cultiu en perfusió però amb una purga de cèl·lules amb un cabal constant de 0,27 ml/min que alimenta al segon bioreactor. La resta de volum que s'acumulària és extret de nou pel mòdul d'ultrafiltració. El cabal d'aliment fresc a la segona etapa és de 0,23 ml/min, suposant un cabal d'entrada al sistema total de 0,5 ml/min, que juntament amb un volum de reactor de 1200 ml proporciona un temps de residència de 40 hores. Si es treballa amb una MOI de 1 coincideix amb el temps d'aparició del màxim de concentració de proteïna intracel·lular. Una vegada s'ha estat operant un centenar d'hores, per tant s'ha produït més de dos cicles infectius, és a dir més de dos temps de residència, es canvien les condicions d'operació.

Una vegada consignats els paràmetres d'operació és deixa que s'estabilitzi el procés. El perfil de concentració de cèl·lules viables a la segona etapa experimenta un augment considerable fins a  $6 \cdot 10^6$  cèl/ml, també degut a que en el bioreactor, en els estadis inicials, no hi havia sortida de cèl·lules. Un cop es posa en marxa l'extracció de cèl·lules s'observa un descens de la concentració fins que comença a estabilitzar-se. A les 110 hores (segona etapa) es procedeix a la infecció, aturant-se la sortida per unes hores per a afavorir l'entrada del virus a la cèl·lula receptora, i minimitzar les pèrdues de virus pel corrent de sortida. Un cop realitzada la infecció s'observa com el perfil de concentració de cèl·lules viables disminueix lleugerament, però gràcies a l'entrada continua de noves cèl·lules es manté estable.

Sota aquestes condicions d'operació i després de 48 hores d'infecció s'assoleix una concentració de proteïna intracel·lular d'aproximadament de 35 µg/ml de reactor. Tot i que el cultiu no es trobi sincronitzat, és a dir, el procés d'infecció es troba en moments diferents mostrant-se una distribució heterogènia en tot el bioreactor (hi ha cèl·lules provinents de la primera fase sense infectar, virus alliberats que tornen a infectar noves cèl·lules...), sembla que la concentració global s'estabilitza en aquest valor. Els paràmetres d'operació es



mantenen per unes 100 hores de cultiu, aproximadament dues vegades i mitja el temps de residència del bioreactor.

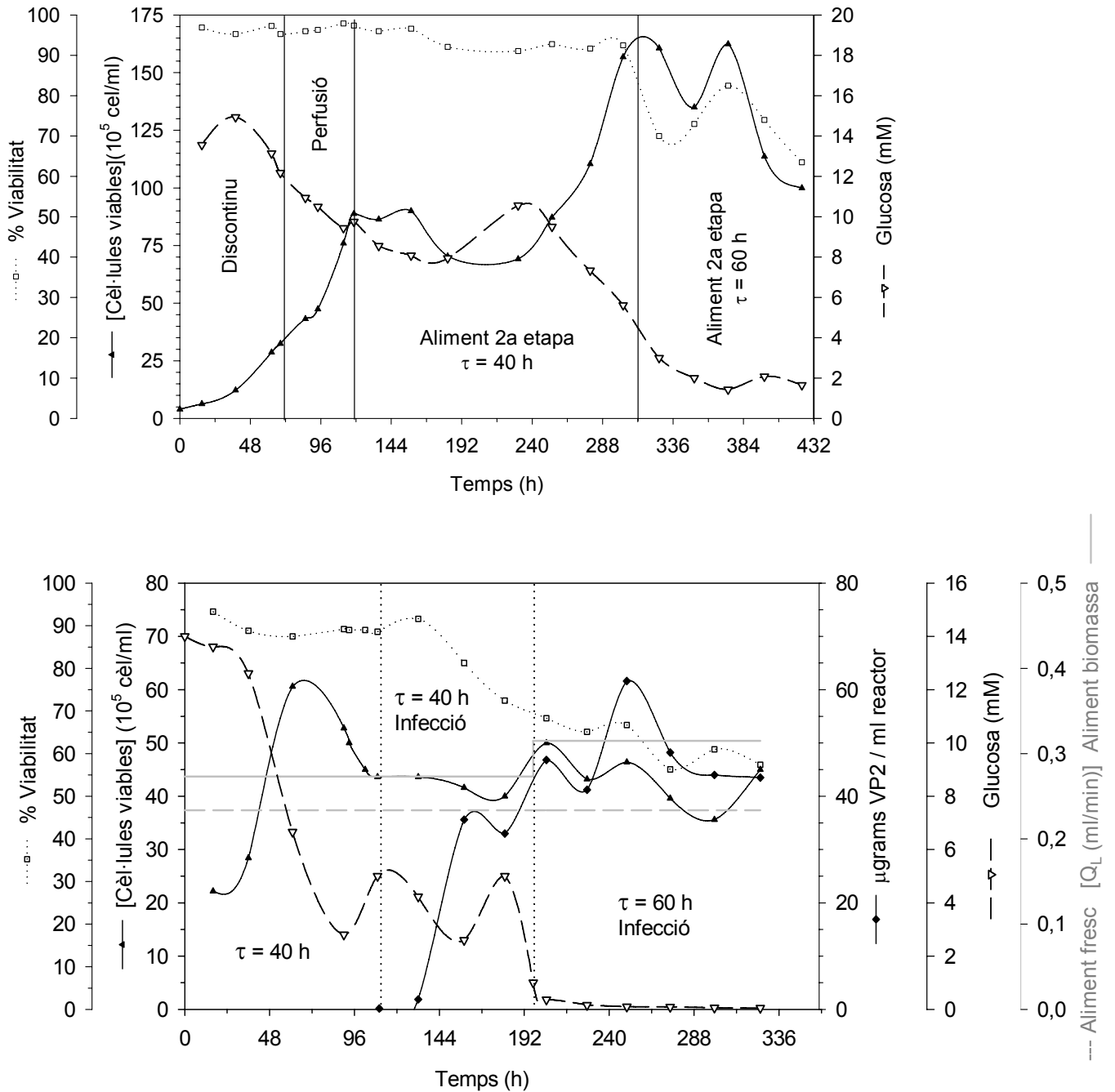


Figura 5-44: Cultiu de Sf9 en dues etapes amb medi IPL-41 suplementat amb hidrolitzat de lactalbúmina, extracte de llevat i un 5% de FBS. Perfils de cèl·lules viables (▲), % de viabilitat cel·lular (□), concentració de VP2 (◆), — cabal d'aliment de cèl·lules i --- cabal d'aliment fresc. Part superior: primera etapa cultiu en perfusió que alimenta la segona etapa. Part inferior: Segona etapa on es realitza la infecció amb el baculovirus recombinant AcVP2.IBDV amb una MOI de 1.

Per estudiar l'efecte del temps de residència sobre la producció de VP2 s'explora unes noves condicions en que s'augmenti el temps de residència. Aquesta decisió es pren un cop mesurada la concentració de glucosa obtenint-se un valor de 5mM a la sortida del segon

bioreactor. L'augment del  $\zeta$  ha de suposar un millor aprofitament dels nutrients, i un marge major per a que es dugui a terme la infecció i l'expressió de la proteïna d'interès. Aquest canvi de condicions es realitza fixant els següents valors:  $Q_{\text{cèl·lules}} = 0,32$  ml/min,  $Q_{\text{aliment}} = 0,23$  ml/min i un  $V=1980$  ml, que proporcionen un  $\zeta=60$  hores.

Al augmentar el cabal de sortida de la primera etapa, la concentració de cèl·lules en aquesta experimenta un lleuger descens que és recuperat posteriorment. El cabal d'alimentació de la perfusió es disminueix degut a l'exhauriment de medi disponible, com es veu reflectit en el tram final del cultiu. Aquest fet no afecta de manera important al sistema que s'està explorant, ja que la concentració de cèl·lules viables no disminueix mai per sota de  $10^7$  cèl·l/mL, per tant queda garantida l'aportació de cèl·lules a la segona etapa.

Tot i els canvis de les consignes d'operació, en la segona etapa la concentració cel·lular es manté dins d'uns marges entre  $3,5$  i  $5 \cdot 10^6$  cèl·l/mL al llarg de tota l'operació. En canvi la concentració de VP2 després de dibuixar un pic de prop de  $60$   $\mu\text{g/mL}$ , s'estabilitza al voltant de  $45$   $\mu\text{g/mL}$ , aproximadament un 20% més que en les condicions anteriors.

Per altra banda, es mesura la concentració de glucosa en les darrers punts del cultiu obtenint valors propers a zero, fet que indica que no es pot augmentar més el temps de residència sense augmentar el cabal d'aliment fresc, operació que de fet és contraposada.

Tot i que no s'ha pogut operar amb uns marges de temps més elevats degut a les característiques del sistema, se'n extreu la conclusió que el fet d'augmentar el temps de residència del sistema d'infecció en continu ha fet augmentar també la productivitat. No obstant, més endavant es realitzarà un estudi més detallat del beneficis que pot aportar aquest tipus de sistemes, ja que si a priori es pot afirmar que s'ha obtingut una major quantitat de producte, també s'ha incrementat el volum de medi de cultiu necessari. Tanmateix, el requeriment de personal i de material, equips i matèria primera també s'incrementa.

## 5.7. Resum dels resultats de producció obtinguts.

Una vegada finalitzada la definició de les estratègies de cultiu i del sistema de monitoratge per a realitzar la proposta d'automatització del procés, es recapitula i es resumeixen els resultats obtinguts amb cadascuna de les estratègies estudiades, des del punt de vista productiu. A la Taula 5-4 es recullen els resultats més rellevants que permetran realitzar una anàlisi comparatiu inicial que permeti escollir el procés a estudiar amb detall en el darrer capítol del present treball. Degut a que les anàlisis econòmiques de processos biotecnològics que utilitzen línies cèl·lules d'animals assignen el 50% del cost productiu al medi de cultiu, es normalitza el valor de concentració de VP2 respecte el medi de cultiu total emprat en cadascuna de les estratègies. Aquest valor és el criteri per a realitzar la tria del bioprocés basat en el sistema *baculovirus-Sf9* per a la producció del candidat vacunal.

Estratègia		[VP2] µg/mL	Volum medi infectat (L)	Volum total medi emprat (L)	[VP2] <sub>c</sub> µg/mL emprat	
Discontínu	MOI = 1,5	22	2	2	22	
	MOI = 0,05	43	2	2	43	
2 etapes discontínu	1 operació	108,6	2	9,58	22,67	
	2 operació	108,6	4	15,39	28,23	
	3 operació	108,6	6	21,2	30,73	
2 etapes continu	ζ=40 h	94 h	38	4,7	23,02	7,75
		300 h	38	15	52,48	10,86
	ζ=60 h	120 h	45	4	25,64	7,02
		300 h	45	10	49,72	9,05

Taula 5-4: Taula resum dels resultats de producció de la vacuna recombinant VP2 emprant el sistema d'expressió la interacció baculovirus-cèl·lula d'insecte. Per cadascuna de les estratègies es mostra el resultat de concentració de VP2 assolida, així com la correcció segons la quantitat de medi necessari per a cadascun dels bioprocessos emprats (darrera columna, [VP2]<sub>c</sub>).

Com es pot observar a la taula, tot i que a priori hom pot pensar que el sistema de dues etapes, primera etapa en perfusió i segona en discontinu, ofereix la concentració de producte més elevada (108,6 µg/mL), i per tant és la més rendible, un anàlisi més detallat normalitzant el valor de la concentració en funció de la quantitat de medi necessari per a la producció, fa arribar a conclusions diferents. El valor de la relació de producte en funció del medi necessari que s'obté finalment és de 22,67 µg/mL. Aquest valor augmenta progressivament fins a 30,73 µg/mL si es dissenya un procés en el qual es van enllaçant diferents etapes d'infecció a partir d'un mateix bioreactor que exerceix la funció de producció de cèl·lules. No obstant, aquest sistema necessita de tres bioreactors mínim (un en funcions de producció de cèl·lules, i dos per a realitzar les infeccions), disseny que comportarà un augment de cost de la planta i de cost de producció.

Per altra banda la taula mostra com els processos amb una relació de producte obtingut respecte el medi utilitzat menor, són els que es desenvolupen en dues etapes, perfusió i infecció en continu. En aquests casos també s'observa que a menor temps de residència, tot i que la concentració de producte en el brou de sortida sigui menor, a nivell de la relació entre la proteïna obtinguda i el volum de medi necessari augmenta. En ambdós casos, a mesura que s'augmenta el temps de funcionament del bioprocés, aquesta relació augmenta, de forma similar al que passava en els cultius amb dues etapes i infecció discontinua. Aquest fet és raonable, degut a que la porció de medi necessari per a desenvolupar els primers estadis de la perfusió es reparteix en les diferents operacions d'infecció de la segona etapa. Això significa que la millora que s'obté a mesura que s'augmenta les etapes d'infecció, s'ha d'estabilitzar, tal i com es pot observar en els valors de proteïna total entre el volum de medi total dels processos de dues etapes amb la infecció en discontinu. Així doncs, de la taula se'n pot extreure la conclusió que el bioprocés que ofereix una major concentració de producte (VP2) referida al volum de medi total utilitzat, i comptant que el medi és la meitat del cost de producció, hauria de ser el bioprocés amb més rendibilitat. En el cas estudiat aquest correspon al cultiu en discontinu infectat amb una MOI de 0,05, que assoleix una concentració de 43 µg/mL. El bioprocés que ofereix la segona millor opció correspon al sistema de dues etapes amb la infecció en discontinu, però a part de la menor concentració de producte per volum de medi necessari, també implica un increment del nombre d'equips necessaris, raó per la qual es descarta d'un inici l'estudi de la seva avaluació econòmica.

## **5.8. Bibliografia.**

Aucoin, M G; Perrier, M i Kamen, A. 2006. Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus ratios. *Biotechnology and Bioengineering*.

Barnes, D i Sato, G. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum free medium. *Analytical Biochemistry*. 102:255-270.

Bedard, C; Tom, R i Kamen, A. 1993. Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnology Progress*. 9:615-624.

Behrendt, U; Koch, S; Gooch, DD; Steegmans, U i Comer, MJ. 1994. Mass spectrometry: a tool for on-line monitoring of animal cell cultures. *Cytotechnology*. 14:157-165.

Bernard, AR; Lusti-Narasimhan, M; Radford, KM; Hale, RS; Seville, E i Graber, P. 1996. Downstream processing of insect cell cultures. *Cytotechnology*. 20:239-257.

Bhatia, R; Jesionowski, G; Ferrance, JP i Atai, M. 1996. Insect cell physiology. *Cytotechnology*. 20:33-41.

Bibila, TA; Ranucci, CS; Glazomitsky, K; Buckland, BC i Aunins, JG. 1994. Monoclonal antibody process development using medium concentrates. *Biotechnology Progress*. 10:87-96.

Bittner, C; Wehnert, G i Scheper, T. 1998. In situ microscopy for on-line determination of biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 60:24-35.

Blissard, GW i Rohrmann, GF. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review Entomology*. 35:127-155.

Campmajó, C; Cairó, JJ; Sanfeliu, A; Martinez, E; Alegret, S i Gòdia, F. 1994. Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis. *Cytotechnology*. 14:177-182.

Casablanca, Antoni. 2001. Optimització del consum de nutrients i generació de subproductes en cultius *in vitro* de cèl·lules animals. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Dorresteyn, RC; Harbrink, KN; Gooljer, CD; Tramper, J i Beuvery, EC. 1996. On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:206-214.

Eyer, K i Heinzle, E. 1996. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*:277-283.

Eyer, K; Oeggerli, A i 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*. 45:54-62.

Faulkner, P i Carstens, EB. 1986. An overview of the structure and replication of baculoviruses. In: *The molecular biology of baculoviruses*; SpringerVerlag. Berlin-New York. 1-17.

Ferrance, JP; Goel, A i Atai, M. 1993. Utilization of glucose and aminoacids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnology and Bioengineering*. 54:697-707.

Finn, B.; Harvey, L. M. i McNeil, B. 2006. Near-infrared spectroscopic monitoring of biomass, glucose, ethanol and protein content in a high cell density baker's yeast fed-batch bioprocess. *Yeast*. 23:507-517.

Francki, RIB; Fauquet, CM; Knudson, DL i Brown, F. 1991. Fifth report of the International Comité on Taxonomy of viruses. Berlin.

Freshney, RI. 1989. *Animal cell culture: a practical approach*. IRL Press. Oxford, Washintong DC.

Gàmez, X. 2000. *Estudi estratègies de cultiu per a cèl.lules d'animals, basades en eines d'instrumentació i control*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Glassy, MC; Tharakan, JP i Chau, PC. 1988. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 32:1015-1028.

Granados, RR i Williams, KA. 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. *The Biology of Baculoviruses*. CRC: 90-127.

Guan, Y; Evans, ME i Kemp, RB. 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*. 58:464-477.

Guarino, LA i Summers, MD. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Virology*. 57:563-571.

Henry, O; Dormond, E; Perrier, M i Kamen, A. 2004. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 86:765-774.

Higareda, AE; Possani, LD i Ramirez, OT. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 56:555-563.

Hink, WF i Bezanson, DR. 1985. *Invertebrate cell culture media and cell lines*. Technology of Life Science. Ireland 1-30.

Hink, WF i Hall, RL. 1989. Recently established invertebrate cell lines. In: *Cell systems applications*. CRC-press, editor: 269-293.

Jorgensen, EB; Casablanca, A; González, G i Gòdia, F. 1997. On-line monitoring of glutamine and ammonium in mammalian-cell cultures. In: *From Vaccines to Genetic Medicine*; Kluwer Ac Pub. Dordrecht, The Netherlands. 429-434.

Kamen, A.A.; Bédard, C.; Tom, R.; Perret, S i Jardin, B. 1996a. On-line monitoring of Respiration in Recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactors cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 50:36-48.

Kamen, A.A.; Bédard, C.; Tom, R.; Perret, S i Jardin, B. 1996b. On-line monitoring of Respiration in Recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactors cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:36-48.

King, GA; Daugulis, AJ; Faulkner, P i Goosen, MFA. 1992. Recombinant  $\beta$ -galactosidase production in serum-free medium by insect cells in a 14-L airlift bioreactor. *Biotechnology progress*. 8:567-571.

Klöpffinger, M; Fertig, G; Fraune, E i Miltenburger, HG. 1990. Multistage production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus insect cell cultures. *Cytotechnology*. 4:271-278.

Konstantinov, KB; Pambayun, R; Matanguihan, R; Yoshida, T; Perusich, C i Hu, WS 1992. On-line monitoring of hybridoma cell growth using a laser turbidity sensor. *Biotechnology and Bioengineering*. 40:1337-1342.

Kurokawa, H; Park, YS; Lijima, S i Kobayashi, T. 1994. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:95-103.

Lecina, M; Soley, A; Gràcia, J; Espunya, E; Lázaro, B; Cairó, JJ i Gòdia, F. 2006. Application of on-line OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 125:385-394.

Lehninger, A. L. 1975. *Biochemistry*. 2nd edition. Worth. New York.

Lovrecz, G i Gray, P. 1994. Use of on-line gas analysis to monitor recombinant mammalian cell cultures. *Cytotechnology*. 14:167-175.

Maiorella, B; Inlow, D; Shauger, A i Hrano, D. 1988. Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*. 6:1406-1410.

Martínez-Torrecuadrada, JL; Lázaro, B; Rodríguez, JF i Casal, JI. 2000. Antigenic properties and diagnostic potencial of baculovirus-expressed infectious Bursal disease virus proteins. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 7:645-651.

Maruniak, JE. 1996. Productivity of insect cells for recombinant proteins. *Cytotechnology*. 20:145-148.

Maurer. 1986. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. A Freshney, editor. IRL Press. Oxford, Washington DC: 13-31.

Meghrou, J; Aucoin, MG; Jacob, D; Chahal, PS; Arcand, N i Kamen, A. 2005. Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a *baculovirus/insect cell* suspension culture system: From shake flasks to 20-L bioreactor. *Biotechnology Progress*. 21:154-160.

Menge, U; Fraune, E; Lehmann, J i Kula, M R. 1987. Purification of proteins from cell culture supernatants. *Developments in biological standardization*. 66 391-401.

Miller. 1997. *The Baculoviruses*. Plenum Press. New York.

Miller, DW; Safer, P i Miller, LK. 1986. An insect *baculovirus* host-vector for high-level expression of foreign genes. *Genetic Engineering*. 8:277-298.

Mitsubishi, J. 1982. Media for insect cell cultures. *Advances in cell culture* 2. Maramorosch ed. New York.

Ogonah, O; Shuler, ML i Granados, RR. 1991. Protein production ( $\beta$ -galactosidase) from a baculovirus vector in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia cells* in suspension culture. *Biotechnology Letters*. 13:265-270.

Olsson, L i Nielsen, J. 1997. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotechnology*. 15:517-522.

Ozturk, SS; Thrift, JC; Blackie, JD i Naveh, D. 1997. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 53:372-378.

Palomares, L.A. i Ramírez, O.T. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*. 22:225-237.

Ranade, A. 2001. Sectoral note. *Biotechnology industry*. Ireland.

Reuveny, S; Kim, YJ; Kemp, CW i Shiloach, J. 1993. Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied Microbiology Biotechnology*. 38:619-623.

Schopf, B; Howaldt, MW i Bailey, JE. 1990. DNA distribution and respiratory activity of *Spodoptera frugiperda* populations infected with wild-type and recombinant *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of Biotechnology*. 15:169-186.

Scott, RI; Blanchard, JH i Ferguson, JR. 1992. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) insect cells. *Enzyme and microbial technology*. 14:798-804.

Shacter, E. 1989. Serum-free media for bulk culture of hibridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol*. 7.

Smith, GE; Frasier, MJ i Summers, MD. 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Virology*. 46:584-593.

Soley, A. 2002. Estudi de cultius d'hibridomaen continu amb perfusió. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Tsao, Y. S.; Cardoso, A. G.; Condon, R. G. G.; Voloch, M.; Lio, P.; Lagos, J. C.; Kearns, B. G. i Liu, Z. 2005. Monitoring *Chinese hamster ovary* cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 118:316-327.

Vlak, JM; Schouten, A; Usmany, M; Belsham, GJ; Klinge-Roode, EC; Maule, A; Van Lent, JW i Zuidema, D. 1990. Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology*. 178:312-320.

Volkman, LE. 1986. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. In: *The molecular biology of baculoviruses*; SpringerVerlag. Berlin-New York. 103-118.

Wang, J; Honda, H; Lenas, P; Watanabe, H i 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*. 80:107-110.



Wilson, ME; Mainprize, TH; Friesen, PD i Miller, LK. 1987. Location, transcription and sequence of a *baculovirus* gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *Journal of Virology*. 61:661-666.

Wong, TK; Nielsen, LK; Greenfield, PF i Reid, S. 1994. Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of *Sf9* insect cell infected with a recombinant *baculovirus*. *Cytotechnology*. 15:157-167.

Wu, P; Ozturk, SS; Blackie, JD; Thrift, JC; Figueroa, C i Naveh, D. 1995. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 45:495-502.

Xu, Y. H.; Sun, J. J.; Mathew, G.; Jeevarajan, A. S. i Anderson, M. M. 2004. Continuous glucose monitoring and control in a rotating wall perfused bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 87:473-477.

Yoon, S i Konstantinov, KB. 1994. Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:983-990.

Zeiser, A.; Elias, C. B.; Voyer, R.; Jardin, B. i Kamen, A. A. 2000. On-Line Monitoring of Physiological Parameters of Insect Cell Cultures during the Growth and Infection Process. *Biotechnology Progress*. 16:803-808.

Zhang, J; Kalogerakis, N; Behie, LA i Latrou, K. 1992. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of *baculovirus* (BmNPV). *Biotechnology and Bioengineering*. 40:1165-1172.

Zhou, W; Chen, CC; Buckland, B i Aunins, J. 1997. Fed-batch culture of recombinant NSO myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 55:783-792.

Zhou, W i Hu, WS. 1994. On-line characterization of a hybridoma cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:170-177.

**6. ESTUDI DE SISTEMES D'EXPRESSIÓ DE  
VP2 EN LLEVATS I BACTERIS.**



## **6.1. Introducció.**

Una vegada desenvolupat el procés per un sistema productiu que emprava com a vector d'expressió el baculovirus utilitzant la línia cel·lular d'insecte Sf9 com a cèl·lula receptora, es vol explorar la possibilitat d'emprar altres sistemes d'expressió, que per la seva naturalesa disten més de l'origen de la proteïna descrita com a candidat vacunal, però que poden fer més viable el procés des d'un punt de vista econòmic.

En aquest capítol es proposa realitzar la construcció de soques d'un sistema d'expressió bacterià (*Escherichia coli*) i d'un sistema d'expressió de llevats (*Pichia pastoris*). L'avantatge que mostren aquests sistemes en front de sistemes d'expressió de cèl·lules animals, i de sistemes virus-cèl·lula receptora, és que són més senzills a l'hora de manipular i de desenvolupar el bioprocés. Són sistemes descrits com a altament productius, i presenten un cost associat al procés *a priori* menor que el cultiu de cèl·lules animals, tot i que aquesta darrera afirmació queda supeditada a la tipologia del producte i al procés de purificació que el producte requereixi. En tot cas, aquest darrer aspecte es podrà estudiar àmpliament en el darrer capítol d'aquest treball una vegada s'hagi pogut valorar i comparar la capacitat productiva d'aquests sistemes.

El principal desavantatge es centra en la limitació d'aquest tipus de sistemes per a expressar proteïnes d'origen animal, ja que presenten certes limitacions tant en realitzar modificacions posttransduccionals (patrons de glicosilació), com en el plegament de les proteïnes, aspecte crític en el cas de proteïnes amb activitat biològica o amb una necessitat d'una estructura tridimensional concreta de la que depengui la seva capacitat funcional, i que com a exemple de funcionalitat, permeti induir la resposta immunològica, com és el cas de la proteïna VP2 triada com a model d'aquest treball.

## **6.2. Sistema d'expressió en llevats: *Pichia pastoris*.**

El primer sistema que s'afronta és el de llevats, degut a que pertanyen al grup d'organismes eucariotes, com les cèl·lules d'insecte o de mamífers, amb una estructuració interna més complexa que els bacteris, amb d'òrgans interns com són el nucli, els mitocondris, l'aparell de Golgi, el reticle, etc., que els hi permeten expressar proteïnes més complexes que els organismes procariotes. La capacitat d'expressar proteïnes complexes es situa a mig camí entre els bacteris i les cèl·lules animals, ja que poden conferir algunes modificacions posttransduccionals com la glicosilació, i un cert plegament de la proteïna, característica sovint essencial per a mantenir la funcionalitat d'aquesta.

A nivell del seu ús com a sistema d'expressió destinat a la sanitat humana i animal, la primera soca construïda data de 1986, i va ser emprada per a expressar una vacuna contra d'Hepatitis B en la soca de llevat *Sacharomices cerevisiae* (Burt *i col.* 1986). Anteriorment, cap als anys setanta, s'havia descrit un restringit grup de llevats que eren capaços de metabolitzar l'alcohol com a font de carboni, els anomenats metilotròfics d'entre els que destaca *Pichia pastoris*. Posteriorment aquest grup fou àmpliament caracteritzat (Higgins i Cregg 1998). La ruta metabòlica per a l'assimilació del metanol s'inicia gràcies a l'enzim alcohol oxidasa (OAX), que és capaç de degradar el metanol fins a acetaldehid, poden arribar a nivells d'expressió molt elevats, conformant fins a un 30% de la proteïna cel·lular total (Cregg *i col.* 1987). Aquesta característica s'utilitzà per a dissenyar els vectors d'expressió de proteïnes heteròlogues per a sistemes de llevats metilotròfics, usant com a promotor de l'expressió el pOAX1, conferint de manera homòloga a la capacitat de sintetitzar alcohol oxidasa, l'expressió de les proteïnes d'interès. Tot i que *Pichia pastoris* disposa d'una duplicat del gen que codifica per l'OAX en el seu genoma, expressant una proteïna molt similar, el 90% de l'alcohol oxidasa és sintetitzada per el gen AOX1. És per aquest motiu que s'empra com a promotor d'expressió el pOAX1.

L'avanç amb el disseny de plasmidis per a la construcció d'aquest tipus de biocatalitzador eucariota, ha permès que es converteixi en un sistema atractiu, i s'ha aconseguit expressar un nombrós grup de proteïnes recombinants, de les que es mostren alguns exemples a la Taula 6-1 (exemples de proteïnes d'origen humà o d'ús per humans, expressades en *Pichia pastoris*). Per tant, aquest és un sistema d'expressió interessant a

considerar en aquest treball, com una alternativa als sistemes estudiats en els capítols anteriors.

Proteïna	Funció	Ús
Fragment C de la toxina del tètanus.	Vacuna	Profilaxi contra el tètanus
Tick Anticoagulant Protein	Agent anticoagulant	Tractament trombosi, transplantament de cor
HIV-1 gp120	Bloquejador de receptors	Tractament SIDA
Insulina	Metabolitzar els sucres	Tractament diabetis.
Factor necrosis tumoral	Prevenició inflamacions	Tractament artritis reumatiode
Interferó- $\alpha$	Resistència cel·lular en front dels virus	Antivirals i antitumorals

Taula 6-1: Llistat d'algunes proteïnes recombinants, les seves principals característiques i la corresponent aplicació, que s'han expressat en diverses soques de *Pichia pastoris*. (Clare i col.:1991; Scorer i col.:1993; Y Wang i col.:2001).

### 6.2.1. Propostes de construcció de diferents soques de *Pichia pastoris*.

Degut a l'ampli ventall disponible de plasmidis que poden ser emprats per a la transformació de soques de *Pichia pastoris*, se'n escolleixen tres que ofereixen diferents característiques que poden influir posteriorment, i de manera diferenciada, al procés d'obtenció de la proteïna VP2. La Figura 6-1 mostra els esquemes dels diferents plasmidis comercials escollits (Invitrogen): pPIC3.5K, pPIC9K, i pPICz $\alpha$ .

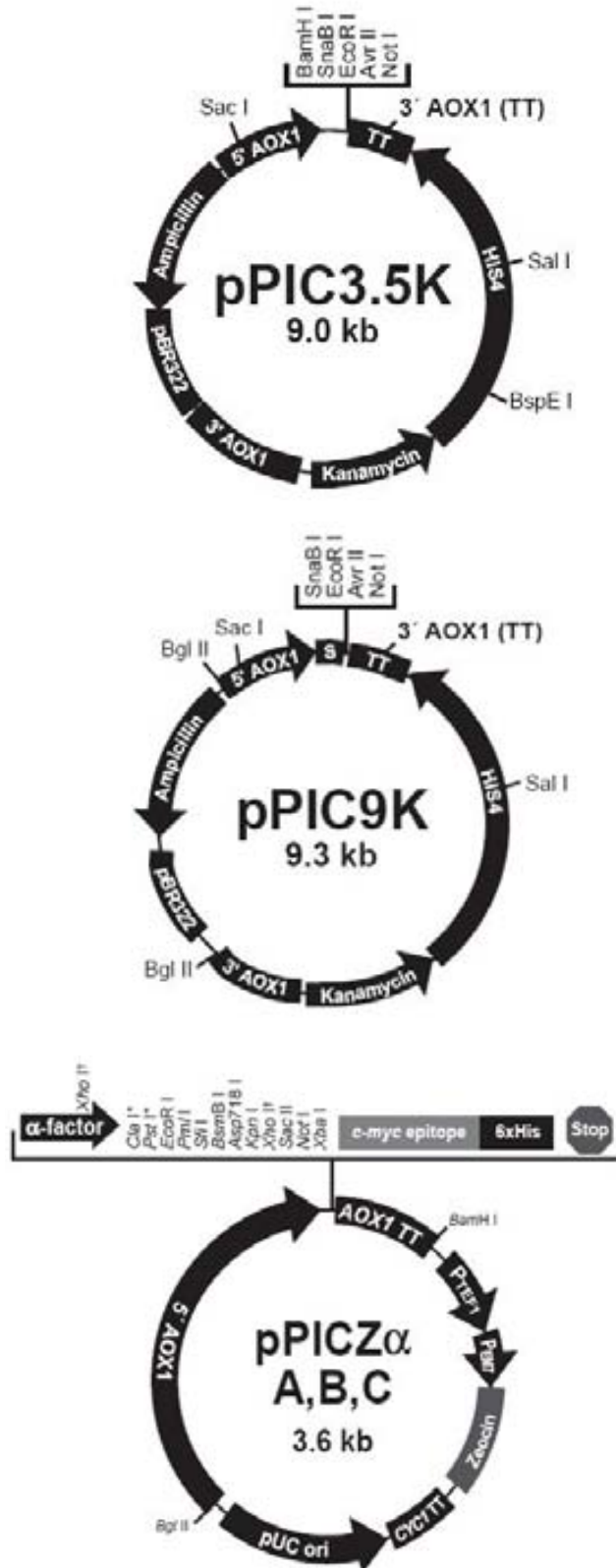


Figura 6-1: Esquema dels plasmidis proposats per a realitzar els constructes que incorporin el gen de VP2 en *Pichia pastoris*.

Els tres candidats ofereixen trets comuns com és la presència d'una seqüència que codifica per una cua d'histidines, que facilita una posterior purificació per cromatografia d'afinitat de l'híbrid que es forma entre la proteïna d'interès i la cua d'histidines, o que situen el Multi Cloning Site (MCS) sota la influència del promotor pOAX1, que com s'ha comentat anteriorment s'indueix amb la presència de metanol en el medi de cultiu, essent un promotor fort i ben reprimat amb simplement presència d'altres fonts de carboni en el medi. A nivell de marcadors de selecció, els plasmidis pPIC3.5K i pPIC9K disposen de resistència a l'ampicil·lina i la kanamicina, dos antibiòtics molt usats en tasques d'enginyeria molecular. Per altra banda pPICz $\alpha$ , disposa de resistència a la zeocina, que és un antibiòtic no tant usual i d'un preu més elevat. La principal diferència entre els plasmidis pPIC3.5K i el pPIC9K o pPICz $\alpha$ , és que el primer expressa la proteïna intracel·lularment, mentre que els segons incorporen un pèptid senyal a la proteïna que permet que s'excreti al brou de cultiu. Aquesta característica pot comportar diferències importants a l'hora de dissenyar l'estratègia de cultiu a seguir, recuperant la proteïna del brou de cultiu mentre es mantenen les cèl·lules en el bioreactor emprant una estratègia de perfusió, tot i que s'haurà de minimitzar els possibles efectes de les proteases alliberades al brou de cultiu, per a evitar la degradació de la proteïna. Finalment, l'avantatge que ofereix el plasmidi pPICz $\alpha$  és la presència de l'epítot c-myc, el qual permet ser reconegut per un anticòs monoclonal específic. Aquesta característica permet el seguiment de l'expressió (ja que el seu gen està situat al darrera del MCS), sense la necessitat d'utilitzar anticòsos específics de VP2 dels que se'n disposa un estoc limitat.

### **Construcció dels plasmidis pPIC9K-VP2 i pPICz $\alpha$ -VP2.**

En primer lloc es desenvolupen els passos per a l'obtenció dels constructes pels plasmidis pPIC9K i pPICz $\alpha$ , representats a la Figura 6-2, que incorporin el gen que codifica per la proteïna VP2. Aquesta primera tasca es desenvolupa en primer lloc degut a que s'ha de modificar les dianes dels extrems per a poder incorporar l'insert al vector per mitjà d'una PCR. En ambdós casos una de les dianes de restricció que es pretén usar és comuna, per tant s'emprarà el mateix oligonucleòtid encebador per a realitzar l'amplificació del DNA, com es mostra a la Taula 6-2.



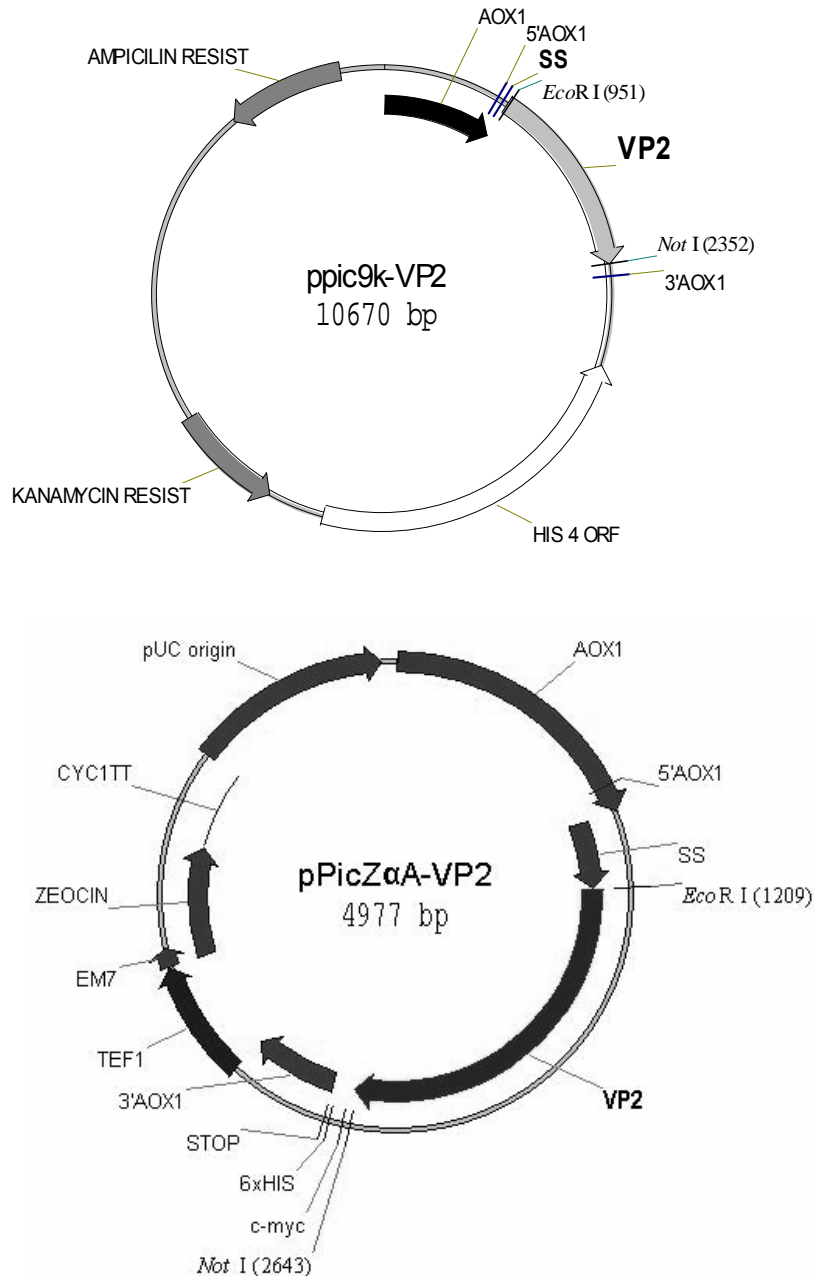


Figura 6-2: Esquema dels constructes dissenyats per a la construcció de les soques de *Pichia pastoris* que expressin VP2, emprant com a base els plasmidis pPIK9K i pPICZα.

Per tal de preparar els inserts, es treballa amb el gen que codifica per VP2 que es mostra a la Figura 6-3. Es dissenya una estratègia de clonació emprant dianes disponibles en el MCS dels dos plasmidis, i sempre que es pugui, que siguin comunes per a agilitzar les tasques de la clonació. Les dianes escollides són: EcoRI i NotI. Per altra banda, com es pot comprovar a la figura del gen de VP2, aquest no disposa internament de les dianes escollides.

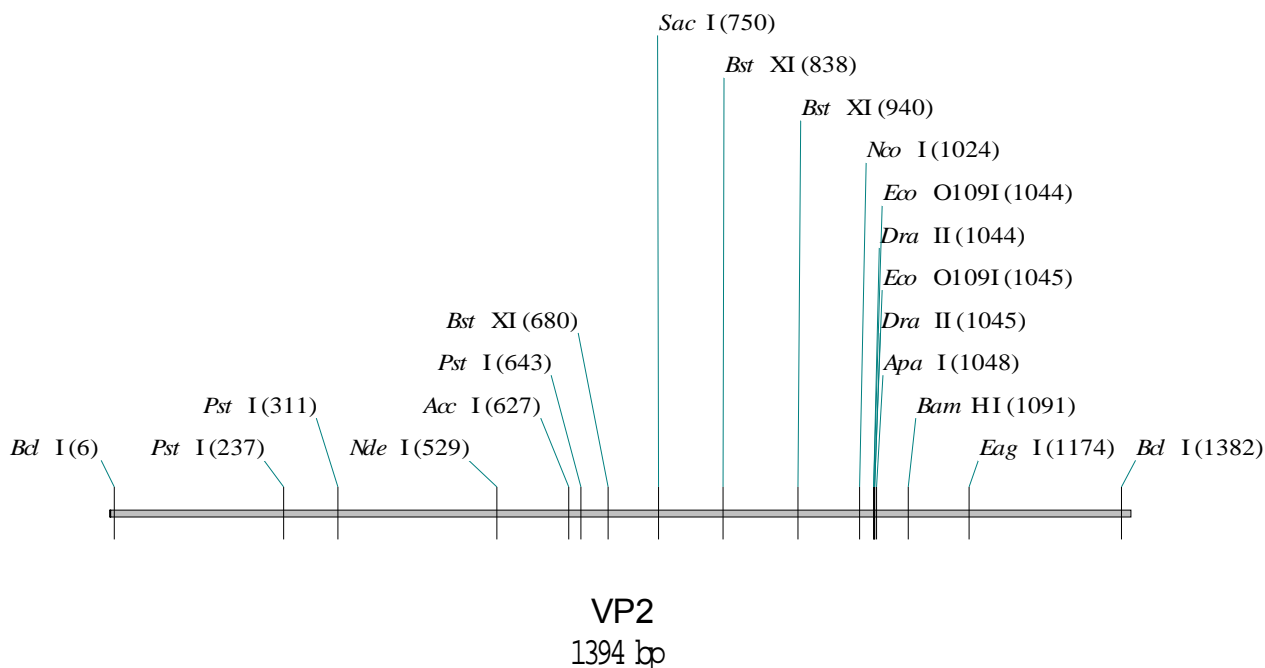


Figura 6-3. Mapa de restricció del gen que codifica per la proteïna VP2 del virus IBD. La seqüència està dotada de dues dianes de restricció de BclI als extrems, que són úniques a tota la seqüència.

Per amplificar el material genètic de l'insert, oferint-li les dianes de restricció que seran emprades per a la inserció del gen de VP2, es dissenyen els oligonucleòtids iniciadors per a realitzar la PCR indicats en la Taula 6-2.

Directe: *Fwp9zEcoRI*: **TACAGGAATTCAQCGATGACAAACCTGTCAGATCAAACC**  
 Revers: *RwpNotI/VP2*: **CTGGTGCGGCCGCTCACACAGCTATCCTCCTTATG**  
 Revers: *RwZaVP2myc*: **CTGGTGCGGCCGCCACAGCTATCCTCCTTATGGC**

Taula 6-2: Seqüència dels diferents oligonucleòtids iniciadors directe i revers per a realitzar les PCR per a amplificar l'insert que codifica per VP2. Negreta: cua de nucleòtids, subratllat: diana de restricció, la resta pertany a la regió homòloga de VP2.

Tot i tractar-se de les mateixes dianes de restricció, s'han hagut de dissenyar diferents oligonucleòtids per a aconseguir que la traducció es realitzi de manera correcta, trobant-se els senyals d'iniciació de transcripció en fase de lectura. La distribució dels diferents oligonucleòtids iniciadors per a l'amplificació de l'insert per a cadascun dels plasmidis proposats es mostra a la Taula 6-3.

	pPIC9K	pPICzα
<b>Oligonucleòtid iniciador directe</b>	Fwp9zEcoRI	Fwp9zEcoRI
<b>Oligonucleòtid iniciador revers</b>	RwpNotIVP2	RwZaVP2myc

Taula 6-3: Taula de distribució dels diferents oligonucleòtids iniciadors per a l'amplificació del gen de VP2 segons el plasmidi de destí de l'insert.

Es realitzen les corresponents anàlisis de les amplificacions per PCR i els resultats que es mostren a la Figura 6-4 on s'observen les bandes en els dos casos amb la mida corresponent al gen de VP2 que és de 1400 pb.

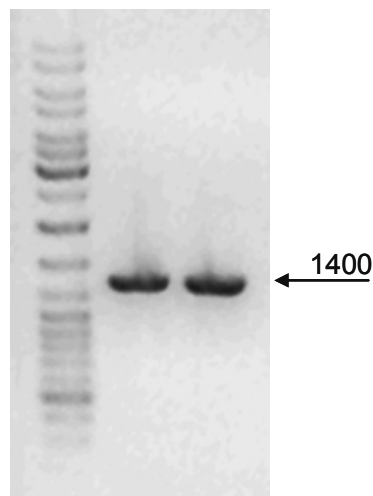


Figura 6-4: Gel d'agarosa on es mostra l'amplificació del gen VP2-IBDV per PCR. C1: DNA Gene Ruler Fermentas. C2: Oligos utilitzats: Fwp9zEcoRI i RwpNotIVP2. C3: Oligos utilitzats: Fwp9zEcoRI i RwZaVP2myc

A continuació, i prèviament a la lligació, es procedeix a la digestió tant dels plasmidis com dels corresponents inserts i es purifiquen amb columnes d'afinitat que no retenen fragments de DNA més petits de 50 pb, evitant així la necessitat de purificació del gen amplificat a partir del gel d'agarosa, on l'eficiència de la purificació disminueix considerablement.

Els plasmidis digerits es valoren qualitativament en un gel d'agarosa que es mostra a la Figura 6-5, on el carril 2 correspon al pPICzα, d'una mida aproximada de 3,6 kb i en el carril 3 pertany al pPIC9K amb una mida de 9,3 kb. Totes les mides corresponents als plasmidis emprats estan en concordància amb les mides teòricament esperades.

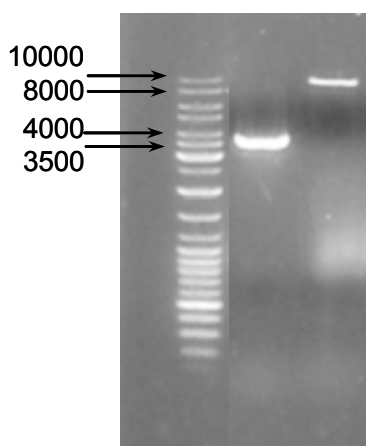


Figura 6-5: Gel d'agarosa per a comprovar l'expansió dels plasmidis que seran emprats per a inserir el gen de la VP2-IBDV. C1: DNA Gene Ruler Fermentas. C2: pPIC9k. C3: pPICzα

Es prossegueix amb la lligació del constructe, que al tractar-se de dianes que ofereixen extrems cohesius, i amb absència d'homologia entre els extrems, ha de permetre obtenir lligacions que només poden estar orientades correctament, sense possibilitat de recirculació o relligació del propi plasmidi.

Per obtenir un bon resultat de lligació és realitzen lligacions amb diferents proporcions entre plasmidi i insert, així com s'inclou també el control positiu i controls negatius per a la transformació de la soca competent d'*E. coli* DH5α. Com a control positiu de la transformació s'empra vector no digerit, i com a controls negatius vector digerit sense insert i una transformació amb absència de material genètic (aigua ultrapura). Els resultats del nombre de colònies obtingudes de les lligacions i conseqüents transformacions es mostren en la Taula 6-4.

	Nombre de colònies per placa	
	pPIC9K-VP2	pPICzα-VP2
C+ Vector no digerit	>200	>200
C- Vector digerit	5	16
C- (aigua)	0	0
Lligació 1:3	178	>200
Lligació 1:6	>200	86
Lligació 1:9	14	25

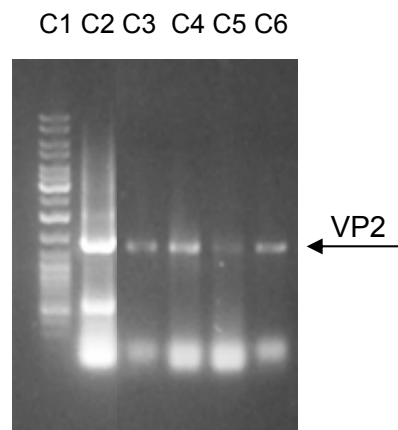
Taula 6-4: Nombre de colònies crescudes en plaques de LB amb ampicil·lina, després de la transformació de la soca DH5α, per diferents proporcions de plasmidi-insert.

Observant els resultats de les colònies que han crescut en els diferents casos es pot concloure que les lligacions han estat correctes. El control negatiu realitzat amb aigua

assegura que la soca transformada no té la capacitat de créixer en un medi amb el marcador de selecció, i el control negatiu amb el vector digerit indica que hi ha hagut una digestió incompleta d'una de les dianes, permetent-se la recirculació del vector. El baix nombre de colònies mostra que hi ha una proporció de plasmidi recirculat molt baixa. Finalment, les lligacions segons la proporció de la quantitat de vector i insert ofereixen resultats més o menys eficients, però en els dos constructes es disposa de dos casos amb suficient nombre de colònies que permet afirmar que s'ha inserit el constructe correctament.

Es realitzen cultius amb medi líquid LB amb ampicil·lina per a disposar de suficient material genètic per a la posterior transformació de la soca de *Pichia pastoris*, amb els constructes en que s'han obtingut més colònies. Del cultiu líquid es realitza una extracció de DNA plasmídic (miniprep, protocol Qiagen) per a realitzar un control del material genètic introduït en gels d'agarosa, però contràriament al que seria d'esperar no s'observa material de les extraccions de DNA realitzades a les soques d' *Escherichia coli* transformades amb el constructe. Amb la intenció de trobar una explicació a aquest fenomen es planteja realitzar una PCR del gen que codifica per VP2 a partir del material genètic no visible en els gels d'agarosa que s'ha extret dels cultius, per a comprovar si hi ha presència de plasmidi suficient que pugui oferir resistència a l'antibiòtic, o de quina manera s'integra el constructe en la soca.

Els resultats de les PCRs es mostren en la Figura 6-6 , on s'observa en tots els casos en que s'ha realitzat l'amplificació d'una banda que coincideix amb la mida de la banda del gen de VP2-IBDV emprat com a control positiu.



---

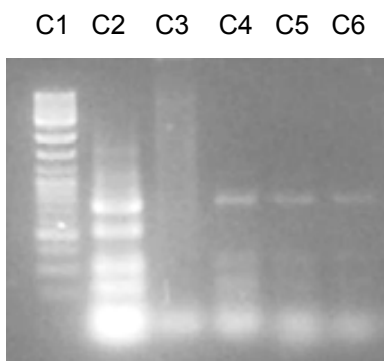
Figura 6-6: Gel d'agarosa on es mostren les PCR realitzades a partir del material genètic extret de les soques transformades. C1: DNA Gene Ruler Fermentas. C2: Control positiu, amplificació del gen VP2-IBDV. C3 i C4 VP2 amplificada del pPIC9K-VP2. C5 i C6: VP2 amplificada del pPIC $\alpha$ -VP2.

---

Per tant, es pot afirmar que hi ha hagut una certa quantitat de material genètic que ha pogut ser introduït a la soca. La hipòtesi que es proposa és que la soca és capaç d'assimilar

una quantitat molt petita del constructe, suficient per a aconseguir obtenir la resistència al marcador de selecció, però per la naturalesa del origen víric del material genètic, aquest no es pot introduir en quantitats suficients o introduir-se de la manera adequada per a continuar amb el treball de manipulació per a la construcció de la soca de *Pichia pastoris*.

L'últim pas per a poder afirmar que el fragment que ha estat amplificat del DNA extret dels cultius líquids és realment la seqüència que codifica pel gen de la VP2, consisteix en realitzar un mapatge amb enzims de restricció del material amplificat. Es planteja emprar l'endonucleasa de restricció PstI, ja que aquesta diana es troba present en tres posicions diferents al llarg de la seqüència de VP2. Si hi hagués una restricció total de les dianes s'haurien d'observar quatre bandes a cada un dels carrils. Els resultats es presenten a la Figura 6-7.



---

Figura 6-7: Gel d'agarosa: on es mostren les restriccions amb PstI de les PCR realitzades al material extret de les minipreps de les soques transformades. C1: DNA Gene Ruler Fermentas. C2: Control positiu VP2-IBDV. C3 i C4 Restricció de la PCR del pPIC9K-VP2. C5 i C6: Restricció de la PCR del pPICzα-VP2.

---

Exceptuant el carril 3, la resta de carrils (del 4 al 6) mostren un patró de restricció igual al que s'observa al carril 2, que correspon a la restricció en del gen de la VP2-IBDV control. Les diferències d'intensitat de les bandes responen a la diferent quantitat de material del qual es parteix d'inici, provinent de les PCRs realitzades.

Així doncs, es pot concloure definitivament que el fragment que s'ha amplificat de les extraccions de DNA plasmídic de les diferents soques que han estat transformades amb els constructes, corresponen a la seqüència de la VP2. Aquest resultat definitiu reforça la hipòtesi que s'ha comentat anteriorment: la lligació ha estat correcte, però la transformació de la soca DH5α o bé no resulta eficient, o la pròpia soca pot assimilar només una petita quantitat del constructe, però suficient per a aconseguir la resistència al marcador de selecció, l'ampicil·lina.

L'origen víric del material genètic que s'està emprant pot ser el causant d'aquest fenomen si més no poc habitual i no desitjable.

## **Construcció dels plasmidis pPIC3.5K-VP2**

Per últim s'explora la possibilitat de realitzar un constructe amb el plasmidi pPIC3.5K sense amplificar per PCR el gen ni modificar les dianes de restricció. La diferència principal de treballar amb pPIC3.5K respecte als dos anteriors plasmidis consisteix en que el gen VP2 disposa de dianes BclI als extrems, i el plasmidi pPIC3.5K disposa d'una diana BamHI, isoesquisomer del BclI, que permet una vegada fetes les restriccions realitzar la lligació sense necessitat de realitzar una PCR. A la Figura 6-8 es mostra un esquema del plasmidi que es vol obtenir amb la inserció del gen de VP2.

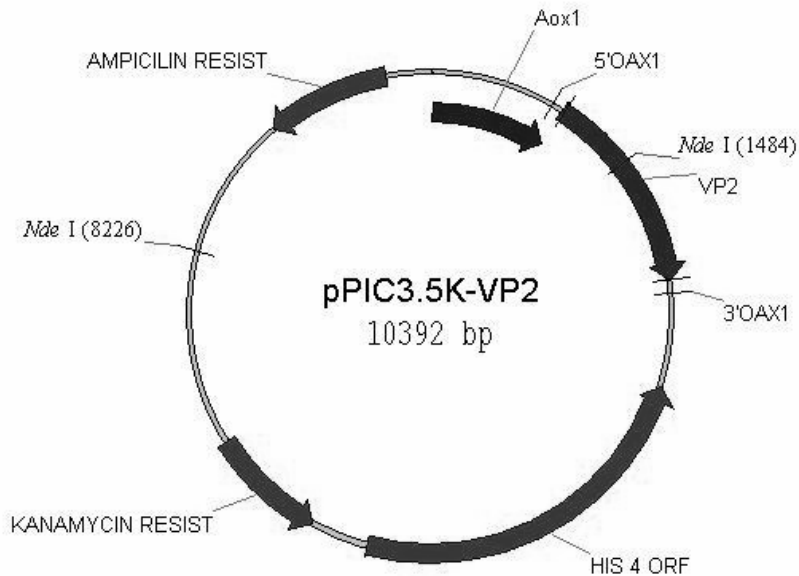


Figura 6-8: Esquema del constructe dissenyat per a la construcció d'una soca de *Pichia pastoris* que expressi intracel·lularment la proteïna VP2, emprant com a base el plasmidi pPIC3.5K. El plasmidi disposa el promotor fort AOX1, ofereix resistència a les soques transformades a l'ampicil·lina i la kanamicina, i finalment dota a la proteïna d'una cua d'histidines.

Una vegada realitzada la lligació es transforma la soca d'*E.coli* competent DH5α per a obtenir plasmidi amb suficient quantitat, i prèviament a la introducció del material a la soca de *Pichia pastoris* és comprova l'orientació amb una restricció amb l'endonucleasa NdeI. Aquesta comprovació és necessària degut a la possibilitat de que el gen sigui introduït en qualsevol de les dues orientacions possibles, ja que s'ha emprat la mateixa diana pels dos extrems i la correcta orientació del insert no està garantida.

La Figura 6-9 mostra la restricció del material genètic extret d'un clon de la *E.coli* transformada al que se li efectua la restricció amb NdeI. Com es pot comprovar en la imatge la mida dels fragments que es generen corresponen a la mida esperada, de 3650 pb i 6742 pb respectivament.

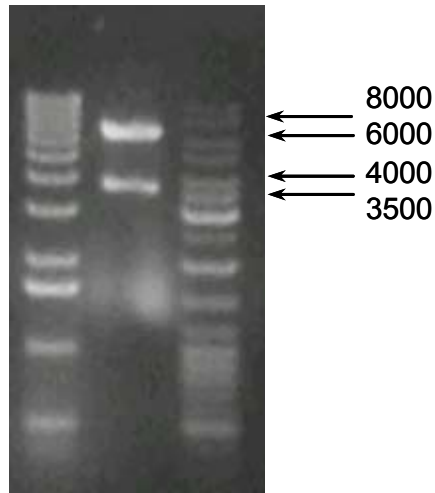


Figura 6-9: Gel d'agarosa on es mostren els fragments de la restricció del plasmidi pPIC3.5K-VP2 emprant la endonucleasa Nde I.

Amb el material genètic comprovat es transforma la soca de *Pichia pastoris* GS115, i els clons positius es comproven realitzant cultius en erlenmeyers d'un litre, amb un volum de 100 ml de medi per a evitar limitacions d'oxigen, i una vegada han crescut s'indueixen amb una addició de metanol gradual al llarg de 96 hores.

Les mostres finals del cultiu induït es lisen mitjançant ultrasons i de la fracció soluble s'elaboren gels de proteïnes per a observar el patró de bandes i un assaig amb anticossos per a comprovar que s'està expressant correctament la proteïna de la qual s'ha introduït el gen. Els resultats es mostren a la Figura 6-10.

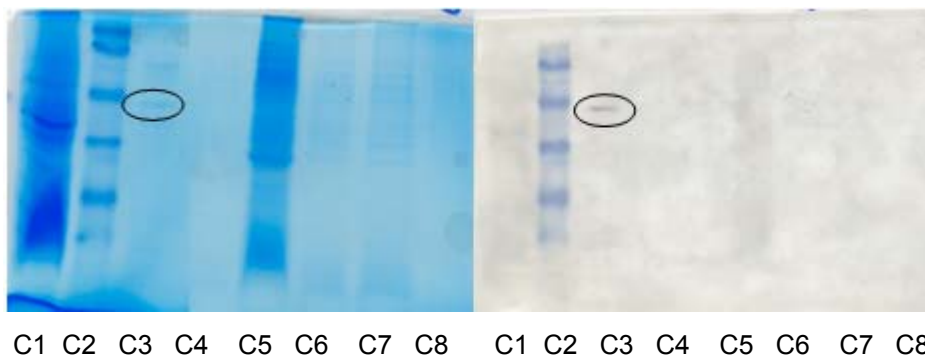


Figura 6-10: Gel de proteïnes (a l'esquerra) i assaig immunològic (a la dreta) dels clons de *P.pastoris* amb el plasmidi pPIC3.5K-VP2. En el carril 1 (C1): control negatiu (*Pichia* sense transfectar), C2: Marcador, C3: C+, C4 (buit), C5 i 6: Clon1 i C7 i 8: Clon 2.



Els resultats mostren que en cap de les dues tècniques s'observen resultats positius d'expressió de VP2 pels diferents clons de *Pichia pastoris*. Aquest resultat fa pensar que o bé els clons que s'han obtingut no han incorporat el gen corresponent a VP2, o bé que s'ha incorporat de forma que no resulta efectiva la seva transcripció, o bé que l'organisme no és capaç d'expressar la proteïna tot i disposar del gen. Per poder confirmar alguna d'aquestes hipòtesis es procedeix a realitzar una PCR de material genètic extret de diferents clons de *P. pastoris*. El resultat de l'amplificació del material genètic és mostra en la Figura 6-11, on es pot observar que tres de quatre clons que han estat comprovats, disposen del gen de la VP2 en el interior del seu genoma. La seqüència d'aquest material genètic amplificat es confronta amb la seqüència original del gen que codifica per VP2, obtenint-se uns resultats de bona correspondència.

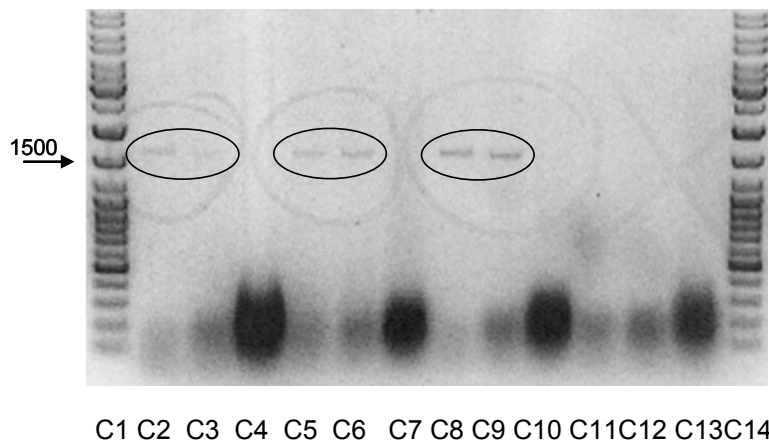


Figura 6-11: Gel d'agarosa on es mostra les amplificacions per PCR del gen de la VP2 provinents del material genètic extret dels clons de *Pichia pastoris*. Carrils 1 i 14: Gene ruler fermentas, C2 i 3: Clon 1, C4,7,10 i 13: Controls negatius, C5 i 6: Clon 2, C8 i 9: Clon 3, i C11 i 12: Clon 4.

Aquest resultat confirma que el gen de VP2, ha estat incorporat dins els clons de *Pichia pastoris* que han estat transformats, però que l'organisme, ja sigui per la posició d'integració o com s'hagi donat aquesta, no permet l'expressió de la proteïna. També s'ha d'esmentar que la intensitat de la banda que s'observa és més moderada del que caldria esperar, cosa que fa pensar que la quantitat de material genètic incorporat no és abundant, malgrat que aquesta és una tècnica no quantitativa.

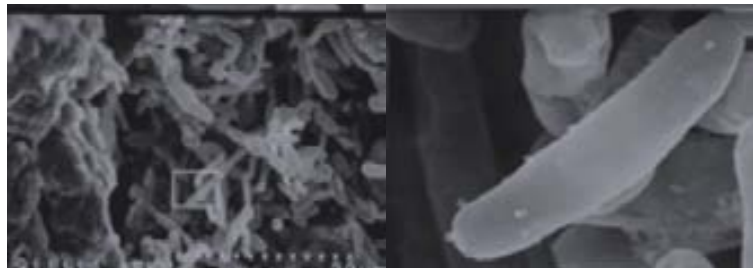
Així doncs, *Pichia pastoris* presenta dificultats per a l'obtenció d'una soca productora de VP2-IBDV. No obstant, la bibliografia recull un parell de casos en que s'ha assolit l'expressió de VP2 en llevats. En el primer dels treballs (Macreadie *i col.* 1990), el gen de VP2 es modifica extraient-li part de les seqüències terminals, o bé afegint-hi alguna fusió amb segments d'altres proteïnes, i els resultats no recullen dades de productivitat, mostrant els

resultats d'expressió amb tècniques de westerns blots, fet que fa pensar que s'obté un baix nivell d'expressió. En el segon cas (Pei *i col.*·2005), s'empra un sistema similar al que s'ha dissenyat en aquest capítol, però no hi ha informació suficientment detallada del procés d'obtenció del constructe ni del seu pas per *E. coli*. Tot i que els treballs semblen indicar la possibilitat d'assolir l'expressió de VP2 en *P. pastoris*, no mostren prou detalls per a poder avaluar el nivell d'expressió de la proteïna d'una forma quantitativa. Sembla doncs possible que, en base a una aproximació de més profunditat, i amb més possibilitats de la que es disposa en aquest treball, potser es podria aconseguir expressar VP2 en *P.pastoris* en suficients quantitats, però els intents efectuats no han estat reeixits.

### **6.3. Sistema bacterià: *Escherichia coli*.**

L'*Escherichia coli* correspon al grup d'organismes unicel·lulars bacterians, concretament al grup dels procariotes. Els bacteris són organismes molt resistents i fàcilment adaptables a diferents condicions ambientals, degut a la capacitat de desenvolupar la majoria de rutes bioquímiques presents en els organismes. S'estima la seva existència al planeta Terra des de fa uns 3500 anys,

El bacteri *Escherichia coli* fou aïllat a finals del segle XIX pel pediatra Escherich de les femtes d'un malalt de còlera, i va ésser identificat com a habitant natural del sistema alimentari i excretor. La seva morfologia és de bacil, que pot mostrar una forma recta o corba (Figura 6-12), d'una mida aproximada entre 1µm de longitud i 0,5 µm d'amplada.



---

Figura 6-12: Imatge obtinguda per microscòpia electrònica d'*E.coli* (Vila-2001). A la dreta es mostra l'ampliació del requadre assenyalat a la figura de l'esquerra.

---

El material genètic presenta una disposició irregular a l'interior del citoplasma, amb absència de cromosomes. També poden disposar de plasmidis, petites molècules de DNA circular amb capacitat de replicació autònoma, capacitat que s'aprofita per a la introducció de material genètic forani amb metodologies senzilles, transformant-les en soques productores de molècules d'interès, o oferint altres avantatges com la resistència a antibiòtics.

Entre els avantatges que presenta aquest bacteri es destaca que ha estat extensament estudiat i emprat per la seva facilitat de ser manipulat per mitjà de tècniques de DNA recombinant, així com un ampli coneixement de les seves rutes metabòliques i de biosíntesi.

L' *Escherichia coli* ha estat emprada amb èxit per a obtenir l'expressió de proteïnes heteròlogues recombinants per a ús terapèutic humà, tal i com es recull en diferents exemples a la Taula 6-5.

Proteïna	Funció	Ús
Calcitonina	Metabolisme fosfat i calci.	Tractament osteomalàcia.
Factor de creixement epidèrmic	Creixement cèl·lules epitelials.	Tractament ferides.
Eritropoetina	Estimulació hematopoesis.	Tractament anèmia.
Factor VIII i IX	Coagulació de la sang.	Prevenició hemorràgies.
Hormona del creixement	Estimulació del creixement.	Promoure el creixement.
Interferó- $\alpha$	Resistència cel·lular en front dels virus.	Antivirals i antitumorals.
Interleuquines 1,2 i 3	Estimulació cèl·lules sistema immunitari.	Antitumorals.
Albúmina sèrica	Proteïna plasmàtica.	Suplement plasma.
Urokinasa	Activació plasminogen.	Anticoagulant.

Taula 6-5: Exemples de diferents proteïnes recombinants amb ús terapèutic humà produïdes emprant *Escherichia coli* com a vector d'expressió. (Doran·1995; Vila·2001)

### 6.3.1. Construcció de les soques d'*Escherichia coli*.

El desenvolupament dels processos que persegueixin objectius orientats en la producció de proteïnes, han de tenir en compte, a l'hora de triar els organismes i els plasmidis per a la construcció de les soques productives, que aquestes tinguin la capacitat d'expressar grans quantitats de proteïna. Així, entre altres aspectes que s'han de tenir en compte en el plasmidi es destaquen: disposar d'un promotor eficient i fort, que disposi d'una bona regulació i posseir una seqüència que permeti amb posterioritat la purificació de la proteïna expressada.

El plasmidi pQE-40 (QIAGEN), que s'ha escollit com a vector d'expressió de la proteïna VP2 del virus IBD, disposa d'un promotor fort (T5), seguit de dues seqüències de l'operador lac que permet una regulació eficaç de la transcripció (veure Figura 6-13). Per altra banda, la soca d'*E. coli* escollida, la M15 disposa de múltiples còpies del plasmidi pREP-4, que expressa de manera constitutiva el repressor *lac*, assegurant així una concentració suficient de la proteïna repressora, que unint-se a les seqüències operadores del pQE-40 impedeix la transcripció de la proteïna recombinant i ofereix una bona regulació de l'expressió. L'addició d'IPTG (inductor de l'expressió) al unir-se a l'operador *lac* desplaça la proteïna repressora tot induint l'expressió de la proteïna recombinant, permetent la transcripció per part de la RNA polimerasa.

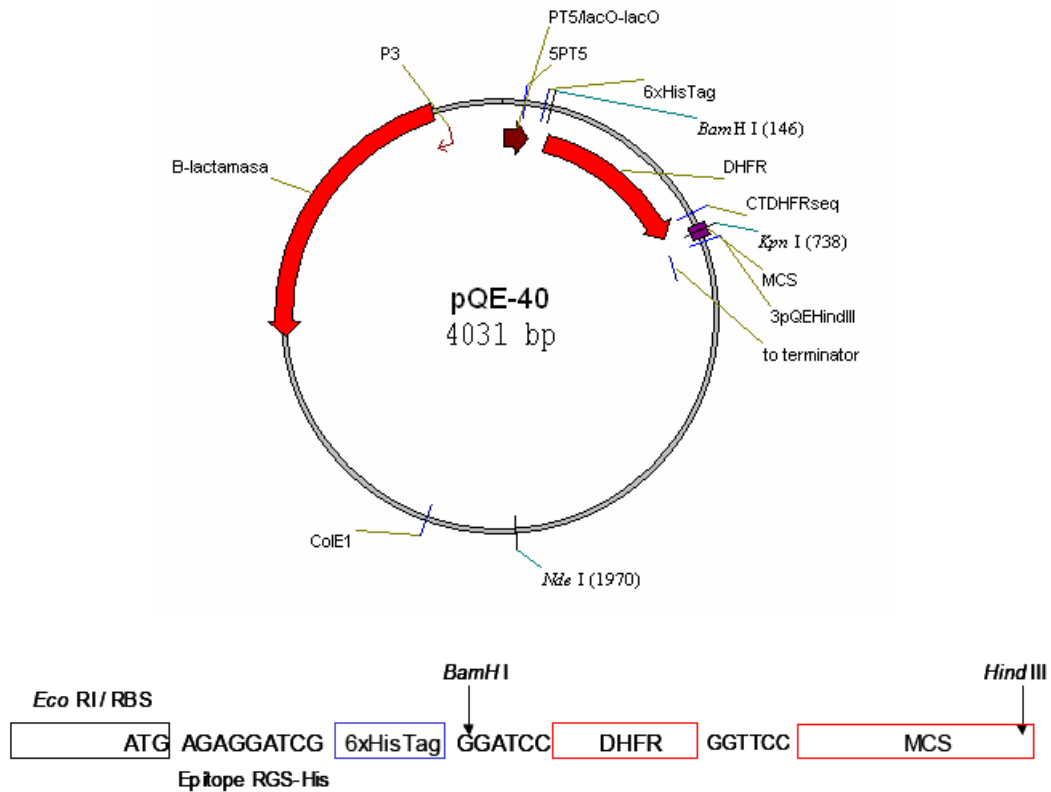


Figura 6-13: Part superior: Esquema del plasmidi comercial pQE-40 (QIAGEN), escollit per a preparar el constructe per a modificar la soca d'*E. coli* M15. Part inferior: Detall del mapa de la seqüència del plasmidi pQE-40 des de l'ATG del plasmidi fins a la darrera diana de restricció del MCS (Multi Cloning Site), Hind III. En el plasmidi s'observa la presència del gen que codifica per la  $\beta$ -lactamasa, que ofereix resistència a l'ampicil·lina, a continuació el promotor pT5 (induïble per IPTG), seguit de la seqüència corresponents a les sis cues d'histidina i la DHFR (dihidrofolat reductasa)

Una altra característica que ofereix el plasmidi pQE-40 és el seu baix nombre de còpies per cèl·lula, ja que permet una regulació més eficient de l'expressió del gen clonat, una bona estabilitat segregacional, així com la capacitat de replicar grans fragments de DNA tot suposant una baixa càrrega metabòlica per a la cèl·lula receptora (Carrier *i col.* 1998; Wilms *i col.* 2001). No obstant, aquestes característiques podrien suposar un nivell d'expressió menor que un sistema que empli un plasmidi d'alt nombre de còpies, però la presència del promotor fort T5 hauria d'assegurar un bon nivell d'expressió proteica.

### **Construcció de la soca pQE-40-VP2-N.**

L'estratègia de clonació dissenyada consisteix en utilitzar les dianes de restricció del plasmidi pQE-40 BamHI i HindIII, ja que són dianes úniques i una vegada realitzada la

restricció ofereixen extrems cohesius, emprant així una estratègia de clonació orientada. Un altre avantatge d'emprar aquestes dianes de restricció consisteix en l'extracció d'un fragment del plasmidi pQE-40 que inclou la seqüència corresponent a la DHFR (di-hidrofolat reductasa), evitant així l'expressió d'una proteïna de fusió de mida més gran. Com es pot observar a la Figura 6-13, la seqüència de la DHFR està situada entre les dues dianes de restricció esmentades. Per altra banda, el gen de 6xHis-tag romandrà en el plasmidi, mantenint així la possibilitat d'expressió de la proteïna amb la cua de 6 histidines per a una futura estratègia de purificació amb columnes d'afinitat de la proteïna d'interès. La última característica del plasmidi és la presència del gen de la  $\beta$ -lactamasa que permet la selecció de les colònies que han estat correctament transformades amb el vector per la seva resistència a l'ampicil·lina. La Figura 6-14 mostra el constructe del plasmidi que s'ha dissenyat.

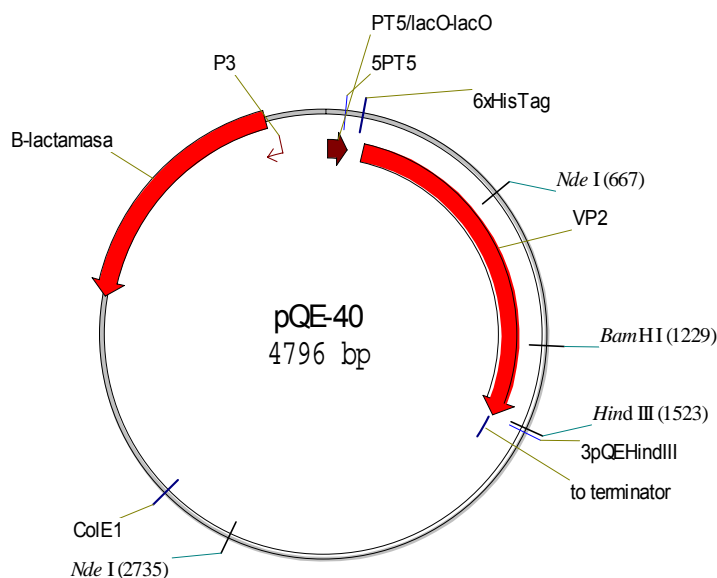


Figura 6-14. Esquema del constructe que s'ha dissenyat per a clonar en la soca M15 d'*E. coli*. S'ha clonat el gen de VP2 en la posició entre les dianes BamHI i HindIII, extraient la seqüència corresponent a la cua d'histidines i la DHFR.

No obstant, s'ha de tenir en compte que la seqüència del gen que codifica per VP2 disposa també en la posició 1091 de la diana BamHI (veure Figura 6-3), no podent-se emprar aquesta endonucleasa per a la restricció dels extrems de la seqüència de VP2. Per aquest motiu es decideix utilitzar les dianes de restricció BclI i HindIII, aprofitant la seqüència de l'extrem comú que disposen entre BclI i BamHI al ser isoèsquismers.

Els extrems de la seqüència del gen que codifica per VP2 disposen de les dianes BclI, de manera que s'amplifica la seqüència de VP2 per PCR, i l'oligonucleòtid iniciador revers

(RwVP2Hind, n°700435) es dissenya per a canviar la diana BclI a HindIII (Taula 6-6), mentre que pel directe es manté la diana BclI.

---

Oligonucleòtid iniciador directe: FwVP2BclI (n°700434) (Diana BclI)

**GAATAGTATGATCAATGACAAACCTGTCAGATCAAACCC**

Oligonucleòtid iniciador revers: RwVP2Hind (n°700435) Diana HindIII

**GCATCTATAAGCTTTCACACAGCTATCCTCCTTATGGCC**

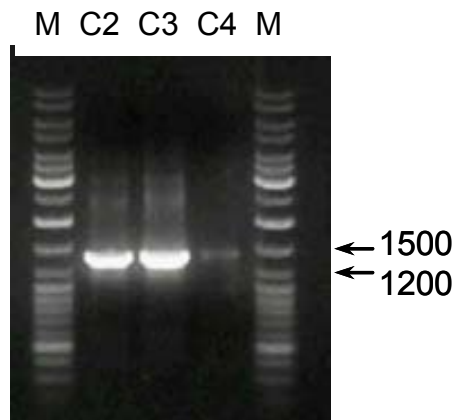
---

---

Taula 6-6 Oligonucleòtids iniciadors utilitzats per a l'amplificació del gen de VP2 per PCR. Les temperatures d'hibridació són de 58,4 °C per FwVP2BclI i de 61,5°C per RwVP2Hind. Negreta: cua de nucleòtids, subratllat: diana de restricció, la resta pertany a la regió homòloga de VP2

---

El resultat de la PCR realitzada emprant els oligonucleòtids descrits a la Taula 6-6 es mostra en la foto del gel d'agarosa de la Figura 6-15, on els carrils 2 i 3 són mostres de la PCR mentre que el 4 correspon al DNA que codifica per la VP2 que s'ha usat com a motlle per a realitzar la PCR. Es pot observar que la mida dels fragments ampliat coincideix amb la mida del DNA motlle.



---

Figura 6-15. Gel d'agarosa per a verificar l'amplificació del gen que codifica el gen VP2-IBDV. Els diferents carrils (C<sub>i</sub>) corresponen a: C1 i C5, DNA Gene Ruler Fermentas. C2 i C3, PCR del gen VP2-IBDV, C4, C+, gen de la VP2-IBDV a partir del qual s'ha realitzat la PCR. Els oligonucleòtids utilitzats són FwVP2BclI i RwVP2Hind.

---

Seguidament es realitza la restricció del plasmidi pQE-40 i del fragment amplificat per PCR. Les restriccions es realitzen en dos passos, purificant la mostra entre pas i pas degut a les diferents característiques de les endonucleases de restricció, tant a nivell de les solucions de reacció, com de temperatures en que es realitza la restricció. Els resultats de les restriccions dels plasmidis es mostren en la Figura 6-16, on els carrils extrems pertanyen al marcador i els carrils centrals a la restricció del plasmidi.

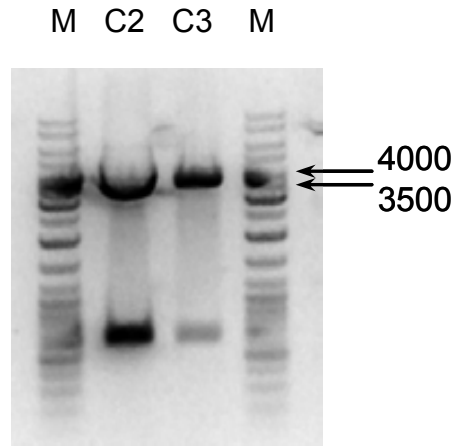


Figura 6-16. Gel d'agarosa per a analitzar el resultat de les restriccions del plasmidi pQE-40. C1: DNA Gene Ruler Fermentas. C2 i C3: pQE40 Ø BamHI Ø HindIII. La restricció es realitza (en els dos casos) en dos passos, purificant entre pas i pas perquè les corresponents endonucleases treballen amb diferents solucions.

Es prossegueix amb la purificació del segment d'aproximadament 3500 pb (pertanyent al plasmidi sense la seqüència) i seguidament amb la lligació del constructe. La transformació de la soca M15-pREP4 es duu a terme mitjançant tècniques d'electroporació. De les colònies positives seleccionades per resistència a l'ampicil·lina, es procedeix a la comprovació de la seva capacitat per a l'expressió de la proteïna VP2. Per això es realitzen cultius en erlenmeyers amb medi LB amb ampicil·lina, per a procedir a la inducció mitjançant IPTG. Les mostres extretes després de cinc hores d'inducció es processen per a realitzar un gel de acrilamida per a observar la sobreexpressió de la proteïna per tinció de Comassie, com per a transferir les proteïnes a una membrana de cel·lulosa per a realitzar l'assaig de reconeixement amb anticossos monoclonals específics que reconeixen la VP2 (Western Blot), que es mostren en la Figura 6-17.

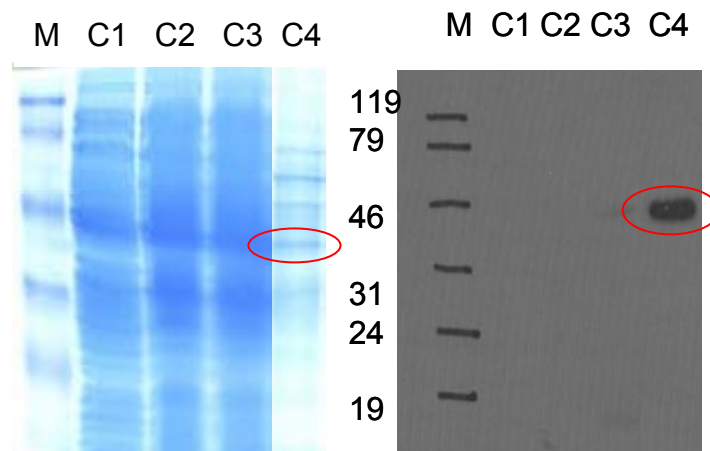


Figura 6-17: Esquerra: gel de proteïnes de les soques d'E. coli transformades amb el plasmidi pQE40-VP2. M: marcador de pes molecular, C1: control negatiu, soca M15 sense transformar, C2 i C3: Clons 1 i 2 de M15 transformats amb pQE40-VP2, i C4: Control positiu, VP2 expressada en *baculovirus* i semi-purificada. Dreta: revelat del western blot del gel de proteïnes. La proteïna VP2 s'assenyala en vermell.



Els resultats dels dos assaigs són negatius, és a dir: entre els carrils dels gels de proteïnes no s'observen diferències entre els corresponents a la mostra de cultiu no induït, cultiu induït i un cultiu d'una soca M15 sense transformar, és a dir entre el carril 1 i els carrils 2 i 3.

Degut a la impossibilitat d'observar diferències entre els carrils es realitza un assaig immunològic (western blot, Figura 6-16 part dreta) per a poder diferenciar específicament la proteïna que es vol expressar. El resultat del western blot és negatiu ja que no s'observa cap banda en els carrils 2 i 3, només observant-se la franja corresponent al control de VP2 en el carril 4 (VP2 expressada mitjançant Sf9-*baculovirus* i semi-purificada).

Tot i els resultats negatius de les tècniques d'anàlisi de proteïnes, la soca que s'ha obtingut continua presentant resistència al marcador de selecció, l'ampicil·lina, indicant la incorporació del gen que codifica per la  $\beta$ -lactamasa. Per altra banda, en els cultius líquids realitzats s'observa que la velocitat màxima de creixement de la soca disminueix significativament, obtenint-se valors propers a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  en comptes de valors entre  $0,4-0,6 \text{ h}^{-1}$  habituals en aquest tipus de soques transformades.

Per tal d'analitzar aquests resultats en que aparentment no hi ha expressió de VP2, es procedeix a fer una anàlisi del DNA plasmídic, a partir d'una extracció d'aquest. La Figura 6-18 (esquerra) mostra el resultat obtingut emprant la tècnica de restricció amb l'endonucleasa NdeI, diana de restricció situada a la posició 667 (en la VP2) i en la posició 2735 del plasmidi pQE40 (veure Figura 6-14).

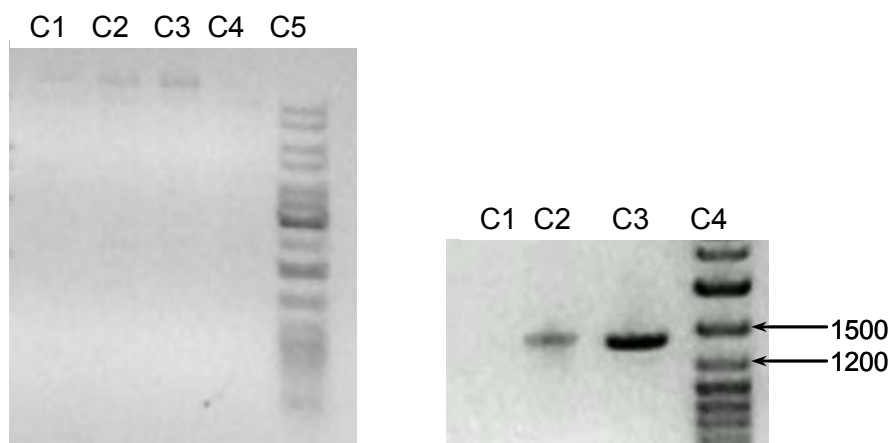


Figura 6-18. Esquerra: Gel d'agarosa de la restricció amb l'endonucleasa Nde I de l'extracció de DNA plasmídic dels clons transfectats i seleccionats. C1: pQE40-VP2-N1, C2: pQE40-VP2-N3, C3: pQE40-VP2-N5, C4: pQE40-VP2-N7 i C5: DNA Gene Ruler Fermentas. Dreta: Gel d'agarosa amb les mostres de PCR: C1: PCR soca M15 sense transformar (C-) C2: PCR del clon pQE40-VP2-N1, C3: C+ i C4: DNA Gene Ruler Fermentas.

Aquesta restricció hauria de proporcionar dos segments de DNA de mides 2068 i 2728 pb, resultat que confirmaria la presència del constructe pQE40-VP2 en la soca. Com es pot observar a l'esmentada figura no s'observa cap de les dues franges corresponents a les respectives mides, i només unes tènues franges per a les diferents colònies aïllades, indicant l'absència del plasmidi tal i com s'havia construït. Per una altra banda, es realitza una amplificació del material genètic d'un extracte cel·lular d'una alíquota del cultiu, emprant com a oligonucleòtids iniciadors els mateixos emprats per a l'amplificació de la seqüència del gen de la VP2 (Taula 6-6). Els resultats es mostren a la Figura 6-18 (dreta), observant-se en el carril 2 una franja d'igual mida que en el carril 3, on es va ubicar el control positiu, mentre que en el carril 1 no hi ha franja i correspon al control negatiu (PCR de la soca M15 sense transformar). Aquest resultat prova la presència del gen de VP2 en el material genètic de la soca, però no en la conformació del constructe creat i ideat inicialment. Al tractar-se del gen d'una proteïna d'origen víric és possible que s'hagi recombinat i integrat en alguna zona no identificada del material genètic de la soca de forma inesperada mantenint el gen de la  $\beta$ -lactamasa actiu, oferint-li així la resistència a l'antibiòtic, però sent incapaç d'expressar la proteïna d'interès. La sobrecàrrega genètica i la localització del nou material introduït, podria justificar la disminució de la velocitat específica de creixement, tot conservant la resistència al marcador de selecció.

Aquests resultats obtinguts repetidament, duen a abandonar la present estratègia de clonació, i a buscar i dissenyar alguna d'alternativa, com l'inserció del gen de VP2 conformant una proteïna de fusió conjuntament amb la DHFR present en el plasmidi, amb la intenció de proporcionar més estabilitat al material genètic introduït a la soca receptora.

### **Construcció de la soca pQE40-VP2-DHFR.**

Donada la manca de resultats positius en la construcció d'una soca de *E. coli* M15 amb el plasmidi pQE-40-VP2, que permetés expressar la proteïna VP2, es dissenya una estratègia de clonació en la que es genera una proteïna de fusió entre la DHFR present en el plasmidi pQE-40 comercial, i el candidat vacunal VP2. S'escull la diana de restricció SmaI del plasmidi com a punt d'inserció, diana que ofereix extrems roms.

En primer lloc i amb l'objectiu d'amplificar i poder disposar de suficient material genètic per a la construcció del nou plasmidi, i obtenir les seqüències apropiades que conjuguin correctament amb els extrems del vector obert, es clona inicialment el gen de la VP2 amb extrems BclI en el plasmidi pIRESneo (Figura 6-19), en la diana BamHI isoèsquisomer de BclI.

La Figura 6-20 mostra l'esquema del constructe del plasmidi pIERSneo-VP2, i les dianes de restricció adjacents a la seqüència introduïda.

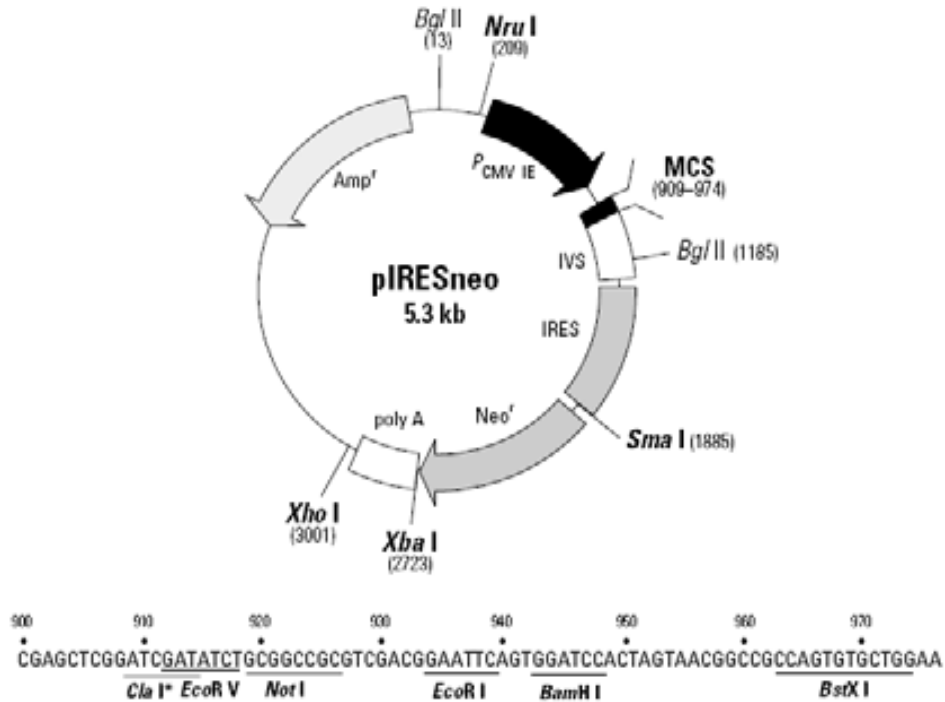


Figura 6-19: Part superior: Esquema del plasmidi comercial pIRESneo (Clontech). Aquest plasmidi disposa de la capacitat d'atorgar resistència a l'ampicil·lina i la neomicina (segons sigui introduït en bacteris o cèl·lules animals). Entre altres elements destacables el plasmidi disposa d'un promotor fort com el *P<sub>CMV</sub>* (Citomegalovirus), i la seqüència IRES (Internal Ribosome Entry Site) per a garantir l'expressió del gen situat a continuació del promotor *P<sub>CMV</sub>*. Part inferior: Detall del mapa de la seqüència del MCS del plasmidi pIRESneo.

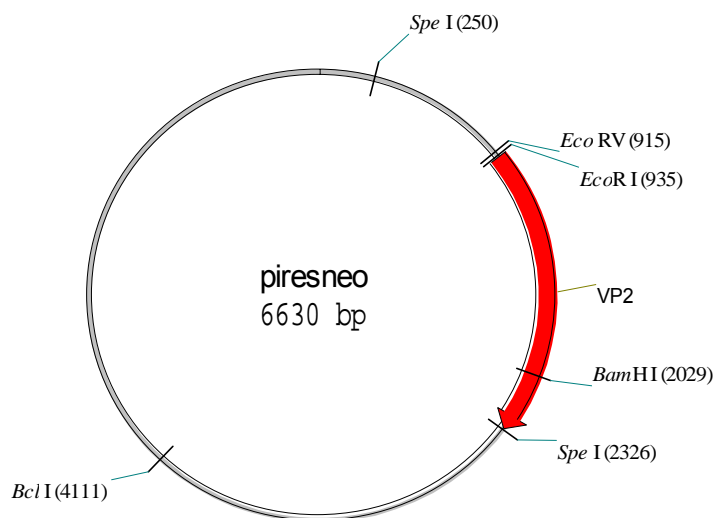


Figura 6-20: Detall del constructe pIRESneo-VP2, on la VP2 ha estat introduïda en la diana de restricció de *Bam* H I del MCS (Multicloning site).

Es seleccionen les colònies amb resistència a l'ampicil·lina, resistència proporcionada per la incorporació del plasmidi pIRESneo, i posteriorment a l'expansió de les colònies aïllades

es realitza l'extracció del DNA plasmídic, i es procedeix a realitzar una restricció d'aquest amb les dianes EcoRV i SpeI, per a obtenir el fragment de VP2.

Prèviament a l'obertura del vector pQE-40 en la diana SmaI, que genera en el vector extrems roms, i a la inserció del fragment en aquesta posició, s'ha de modificar l'extrem del fragment corresponent a la diana de restricció SpeI, ja que genera extrems cohesius, mentre que la diana EcoRV ja proporciona extrems roms als fragments que se'n deriven. Per aquesta raó es procedeix al reompliment de la seqüència d'aquest extrem, per a transformar l'extrem cohesiu a extrem rom, compatible amb el vector de destí. Una vegada realitzada l'adaptació del extrem i la purificació del fragment, es procedeix a la introducció del gen en el plasmidi pQE40, com ja s'ha comentat anteriorment en la diana SmaI (Figura 6-21).

Aquest tipus d'estratègia de clonació proporciona dues tipologies de colònies resistents a l'ampicil·lina, segons la orientació que hagi adoptat el fragment. Per aquest motiu s'han de descartar aquelles colònies que hagin incorporat el gen d'interès en la orientació inversa, i seleccionar les que disposen de la orientació esperada, que permetran que s'expressi la proteïna d'interès de forma correcta. La comprovació de l'orientació del fragment es desenvolupa per mitjà de restriccions que ofereixin fragments del plasmidi de mides diferenciades.

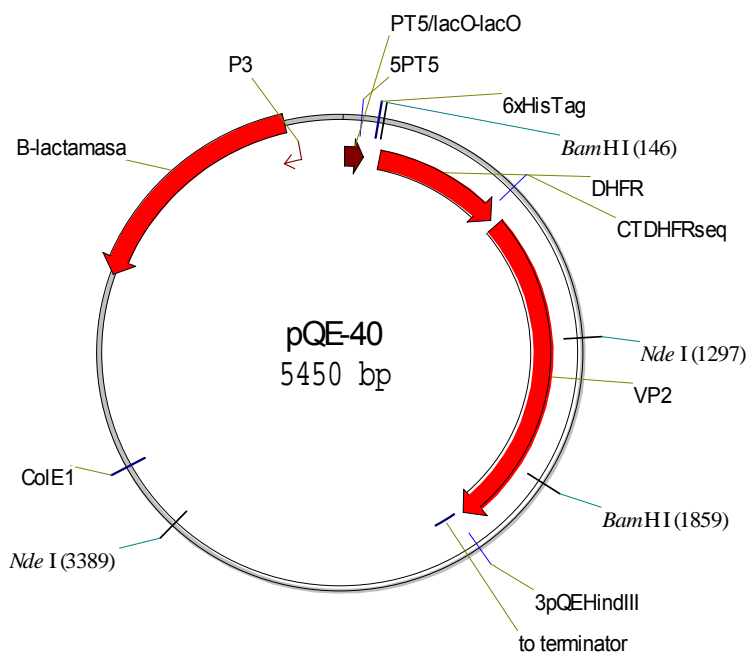


Figura 6-21 Mapa del vector pQE40-VP2-DHFR. On el fragment corresponent a la Vp2 ha estat introduït a la diana SmaI del MCS.

Es procedeix a la restricció emprant l'endonucleasa NdeI, que talla en dues posicions diferents el constructe. Un tall s'efectua en el fragment de VP2, i l'altre en el plasmidi. El punt de tall de la diana NdeI en VP2, no està centrat en la seva seqüència (Figura 6-21), de forma que depenent de l'orientació en que s'hagi introduït el plasmidi, els fragments resultants de la restricció seran de mides diferents. En el cas dels constructes ben orientats les mides dels dos fragments han de correspondre a 2103 i 3344 pb, i en cas contrari les mides que s'haurien d'observar serien de 1769 i 3678 pb. La Figura 6-22 mostra el gel d'agarosa on es poden contemplar les mides dels segments de DNA obtinguts en un dels casos en que l'orientació és correcta. En la figura es mostra les restriccions efectuades als clons 2 i 5.

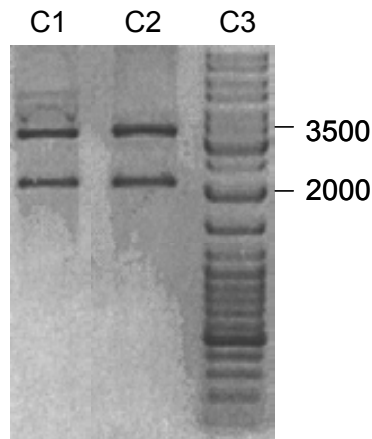


Figura 6-22 C1: Restricció del DNA plasmídic extret de la soca de M15 transfectada utilitzant la endonucleasa NdeI. C2: Gene Ruler DNA (Fermentas)

Del conjunt de clons que disposen del mateix patró de restricció, es seleccionen els clons 2, 5, 7 i 9, que esdevenen els candidats a soques per a l'expressió de la VP2-DHFR.

Independentment, es realitzen amplificacions per PCR del segment d'interès del plasmidi obtingut, emprant diferents oligonucleòtids iniciadors recollits a la Taula 6-7, per tal de comprovar que la mida del fragment sigui la correcta, considerant tant la proteïna de fusió DHFR-VP2 com únicament l'amplificació de la VP2.

Identificador PCR	Oligonucleòtids iniciadors	Mida fragment	Fragment amplificat
PCR_1	CtDHFRseq	3pQE <sup>Hind</sup> III	Fusió DHFR-VP2
PCR_2	FwVP2BclI	RwVP2 <sup>Hind</sup>	Gen VP2

Taula 6-7: Recull dels diferents oligonucleòtids iniciadors i les seves característiques emprats per a realitzar la comprovació del plasmidi pQE04-VP2-DHFR

Les mides dels fragments resultants de les diferents amplificacions realitzades del constructe pQE40-VP2-DHFR es mostren en la Figura 6-23. Els carrils 2 i 3 corresponen al clon 2 aïllat de la soca transformada, mentre que els carrils 4 i 5 corresponen al clon 5.

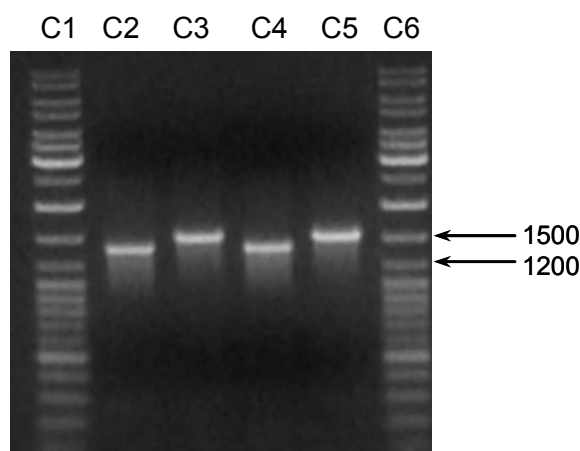


Figura 6-23 Comprovació per PCR de la soca de M15 amb el constructe pQE40-VP2-DHFR, utilitzant diferents oligonucleòtids iniciadors. El C2 i C3 corresponen al clon 2 i els C4 i C5 corresponen al clon 5. C1 i C6: Gene Ruler Fermentas. C2 i C4: Oligonucleòtids utilitzats: FwVP2BclI i RvVP2Hind. El fragment que s'espera és de 1400 pb. C3 i C5: Oligonucleòtids utilitzats: CtDHFRseq i 3pQEHindIII, en que hauria d'obtenir-se un fragment de 1527 pb.

Analitzant els resultats del clon 2 (carrils 2 i 3), s'observa que en el carril 2, en el que s'ha emprat els oligonucleòtids que s'uneixen a la VP2, per tant excloent de l'amplificació la DHFR, mostra una banda d'uns 1400 pb que correspon a la mida del gen de VP2, inferior a la banda que s'observa en el carril 3, que incorpora la seqüència de la DHFR i que li correspon una mida teòrica de 1527 pb. Aquests resultats són homòlegs als que s'observen pel clon 5, carrils 4 i 5. Aquests resultats mostren que el constructe introduït a la soca d'*E. coli* M15pREP4 correspon al constructe que s'havia ideat, mantenint-se la proteïna de fusió DHFR-VP2.

Finalment, es procedeix a realitzar la confirmació de la capacitat dels clons aïllats, que han estat transformats amb el plasmidi del constructe, d'expressar la proteïna d'interès. Es realitzen cultius en erlenmeyers, i a mitja fase exponencial se'ls addiciona l'inductor de l'expressió, 1mM d'IPTG. Després de 5 hores d'inducció, es recuperen les cèl·lules, es lisen per mitjà d'ultrasons i es realitza un assaig amb un gel de proteïnes amb Comassie i un assaig immunològic. Amb aquests assaigs es pretén comprovar que s'està expressant la proteïna amb una seqüència reconeixible pel anticòs monoclonal específic per la VP2. El gel de proteïnes es mostra a la Figura 6-24, mentre que el revelatge per mitjà de tècniques immunoquimioluminiscentes, el Western Blot, es mostra a la Figura 6-25. En ambdós casos el primer carril hi ha el marcador de pes molecular, seguit dels diferents clons que s'han aïllat (clons 2, 5, 7 i 9), del control negatiu (M15 sense transformar) i finalment el control positiu (VP2

expressada en *baculovirus* recombinant). La mida de la proteïna viral VP2 és de 41 kDa, però si tenim en compte la fusió amb la DHFR, la nova proteïna ha de ser d'una mida d'uns 74 kDa si es considera des de l'ATG que duu el plasmidi pQE-40.

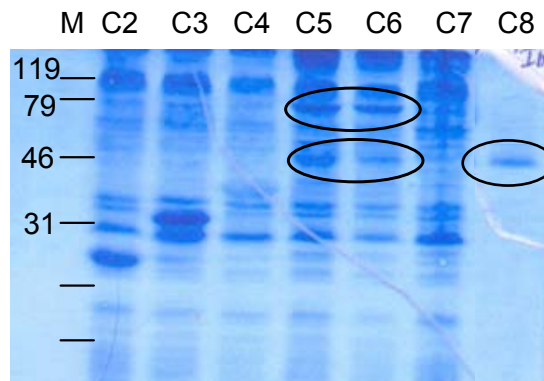


Figura 6-24: Imatge del gel de proteïnes efectuat amb mostres dels clons pQE40-VP2-DHFR. C1: Marcador de pes molecular. C2: Clon 5. C3: Clon 10. C4: Clon 7. C5: Clon 9. C6: Clon 2. C7: C-, cultiu sense induir. C8: C+ Vp2 purificada i emmagatzemada en solució estabilitzant.

A primer cop d'ull al gel d'acrilamida tenyit amb Comassie Blue s'observa diferències entre els clons que s'han analitzat, mostrant els clons 2 i 9 (carrils 5 i 6) un patró de bandes diferenciats que podrien correspondre a la mida de la proteïna de fusió (banda superior) i a la proteïna VP2 sense la DHFR. Per a poder confirmar-ho es necessari analitzar l'assaig específic mitjançant anticossos monoclonals per VP2.

L'anàlisi immunològic corresponent confirma que hi ha dos clons productius (clons 2 i 9, corresponents als carrils 5 i 6) tant de la proteïna VP2 (en aquest cas la transcripció de la proteïna s'ha iniciat al ATG situat a la seqüència del gen que codifica la proteïna) mostrant una banda reconeguda per l'anticòs d'una mida de 41 kDa que coincideix amb la que mostra el control positiu, com de la proteïna de fusió VP2-DHFR, observant-se una banda de 74 kDa, corresponent a la proteïna que es tradueix a partir del ATG situat en el plasmidi pQE-40.

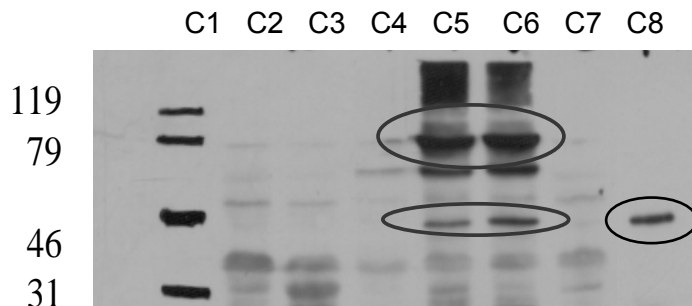


Figura 6-25: Western Blot de cultius induïts. C1: Marcador de pes molecular. C2: Clon 5. C3: Clon 10. C4: Clon 7. C5: Clon 9. C6: Clon 2. C7: C-, cultiu sense induir. C8: C+ Vp2 purificada i emmagatzemada en solució estabilitzant.

Per altra banda, s'observa que la resta de clons que s'han aïllat són molt menys productius, o senzillament no són productius. Si s'observa el control negatiu de la soca M15 sense transformar es confirma l'absència de proteïnes d'igual mida que les proteïnes d'interès reconeixibles per l'anticòs utilitzat.

Tot i obtenir clons positius que expressin la VP2-DHFR, sorgeixen noves anomalies ja que després de cinc subcultius en un nou cultiu induït s'observa la pèrdua de l'expressió de la proteïna, per tant es pot considerar que la soca que s'ha generat no és estable. Després d'obtenir resultats negatius en assaigs immunològics, es realitza de nou una extracció del DNA plasmídic de la soca d'*E. coli* i es recomprova el material genètic. Es procedeix a realitzar dues restriccions diferents per a comprovar el material genètic: la primera es realitza amb NdeI, amb la que s'han d'obtenir dos fragments de mides 2103 i 3344 pb, com ja s'havia obtingut anteriorment (veure Figura 6-22), i la segona es realitza amb SphI, que és una diana única (del Multi Cloning Site) i conseqüentment s'hauria d'observar una banda de mida totalment equivalent al constructe (5450 pb).

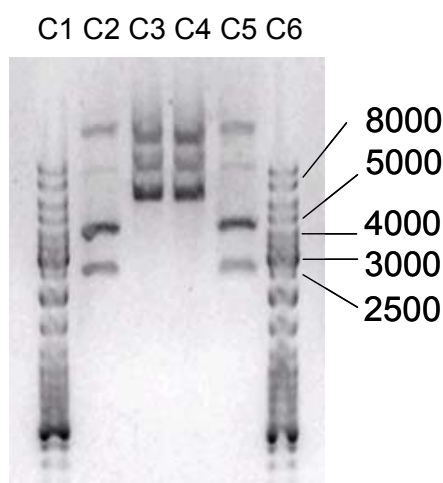


Figura 6-26: Gel d'agarosa on es mostren les restriccions del plasmidi de la soca M15 pQE-40-VP2-DHFR, després de diversos subcultius. C1 i C6: Gene ruler DNA ladder. C2 i C5: restricció amb NdeI dels clons 2 i 9 i C3 i C4: restricció amb SphI dels clons 2 i 9.

Els resultats que mostra el gel són idèntics pels clons 2 i 9 (clon 2 correspon als carrils 2 i 3, mentre que el clon 9 correspon als carrils 4 i 5). Al realitzar la restricció amb NdeI els fragments que s'obtenen són de mides més grans del que s'esperaria, aproximadament de 2800 i 4300 pb. La suma de la mida d'aquests fragments coincideix amb el resultat de la restricció única que proporciona la endonucleasa SphI, que és d'una mida de 7100 pb. Aquests resultats indiquen que el constructe no és estable, i a mesura que es replica el material genètic, aquest augmenta la seva mida. Aquest fet s'hipotetitza que pot ser degut a la generació d'alguna zona on hi ha un aparellament de dues seqüències que estructuralment



generen un llaç formant subestructures de DNA ("loop"), i la polimerasa replica en més d'una ocasió la seqüència del llaç fent augmentar la mida del material genètic que conforma el plasmidi.

Així doncs, es pot afirmar que s'ha aconseguit generar el constructe i una soca que expressa la proteïna definida com a candidat vacunal en *E. coli*, no obstant, el nivell d'expressió no és molt elevat, i s'expressa la proteïna fusionada amb DHFR. La quantificació de les bandes obtingudes per mitjà de tècniques de densitometria determina uns valors d'expressió baixos. La soca té el problema afegit de la pèrdua d'expressió de la proteïna degut a la manca d'estabilitat del material genètic, que no es replica fidelment a mesura que augmenta el nombre del subcultius.

Les dificultats d'expressió de VP2 de IBDV en *E. coli* que s'han descrit fins al moment, coincideixen en certa manera amb resultats publicats per altres investigadors. Una poliproteïna de la càpside va ser expressada en *E. coli*, però el producte expressat no oferia resposta immunitària en les aus (Jagadish *i col.*:1988). Un altre estudi reporta l'expressió mitjançant *E. coli* de VP2 que ofereix protecció a les aus que són vacunades, però no mostra dades de productivitat, és més, la única forma de mostrar els resultats de l'expressió és mitjançant un western blot, indicant així una baixa productivitat del sistema (Rong *i col.*:2005). De manera similar (Omar *i col.*:2006), no aporten dades quantitatives d'expressió i mostren els resultats amb tècniques altament sensibles (immunològiques quimioluminscents). Les dades d'eficiència vacunal recullen dosis de 50 µg de VP2 purificada i 150 µg d'extracte sense purificar (més de 15 cops superior a les emprades en les proves de protecció de VP2 expressada en baculovirus), i mostren eficàcies de protecció contra una soca virulent de IBDV al voltant del 30-40 %.

Per altra banda altres autors han estudiat la clonació i expressió de partícules virals en *E. coli* obtenint resultats similars als d'aquest treball (M Vidal *i col.*:1991). En l'obtenció d'una soca que expressés la proteïna VP1 del virus causant de la febre aftosa, van obtenir clons que produïen la proteïna idèntica a la provinent del virions, però el constructe mostrava molta inestabilitat i toxicitat en la soca, que acabava mutant o morint al cap de poques setmanes, inclús sota condicions de no inducció. L'estabilització l'aconseguien mitjançant la clonació únicament de fragments de la proteïna VP1 un cop identificat el fragment de la seqüència responsable de la inestabilitat.

## **6.4. Canvi de proteïna problema: *B*-galactosidasa.**

El treball efectuat a nivell de transformació de les cèl·lules d'*E. coli* i *P. pastoris* per a expressar la proteïna d'interès VP2 no ha donat bons resultats, en la mesura que la proteïna o no s'expressa o s'expressa amb dificultat i sense estabilitat. És possible que les causes vagin lligades a la naturalesa vírica de la mateixa proteïna, o la necessitat d'introduir modificacions substancials en el procés de transformació de les cèl·lules que no s'han pogut identificar. De totes maneres, aquest treball s'ha plantejat per a realitzar una anàlisi global del procés i de l'estudi de diferents alternatives. Per tal de poder aprofundir en aquesta anàlisi, es decideix fer un canvi en la proteïna problema i expressar la  $\beta$ -galactosidasa, un cas ja desenvolupat. Aquest canvi ha de permetre realitzar el desenvolupament i anàlisi del procés amb  $\beta$ -galactosidasa, sota la hipòtesi de que disposaria de característiques molt similars a nivell de creixement i desenvolupament del cultiu, que una potencial soca que expressés la VP2, i per tant fer possible la comparació dels diversos sistemes productius.

En el cas del sistema d'expressió bacterià, l'estudi es realitza per a dos vectors d'expressió amb diferents característiques: el pTCO46- $\beta$ gal induïble per IPTG i pJCO46- $\beta$ gal induïble per temperatura (cedits pel Dr. Toni Villaverde, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, IBB, de la UAB). Per altra banda en el sistema d'expressió de llevats, s'escull la soca de *Pichia pastoris* GS115 que duu el gen *lac z* que codifica per la  $\beta$ -galactosidasa. (cedida pel Dr. Isidre Gisbert, IBB, de la UAB).

En els propers capítols s'estudia i es desenvolupa el procés de producció de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa, tant en el cas de les diferents soques bacterianes com de llevat, centrant-se en descriure el medi de cultiu més apropiat, el desenvolupament de l'estratègia de cultiu més productiva i les eines de control necessàries per a dur a terme els cultius.

## **6.5. Bibliografia.**

Carrier, T; Jones, KL i Keasling, JD. 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. . *Biotechnol. Bioeng.* 59(6):666-672.

Cregg, JM; Tsxhopp, JF; Stillman, C; Siegel, R; Akong, M; Craig, WS; Buckholz, RG; Madden, KR; Kellaris, PA; Davis, GR i altres. 1987. High level expression and efficient assembly of the Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio. Technology* 5:479-485.

Higgins, DR i Cregg, JM. 1998. *Pichia* protocols: Introduction to *Pichia pastoris*. H Press, editor. New Jersey.

Jagadish, MN; Staton, VJ; Hudson, PJ i Azad, AA. 1988. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *E. coli* by its own virus-encoded polypeptide. *Journal Virology* 62:1084-1087.

Omar, AR; Kim, CL; Bejo, MH i Ideris, A. 2006. Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Veterinary Science* 7(3):241-247.

Pei, WC; Hung, SY; Long, LH; Der, LT; Pei, YC i Hung, LJ. 2005. Secreted expression of the VP2 protein of very virulent infectious bursal disease virus in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods* 123(2):221-225.

Rong, J; Cheng, T; Liu, X; Jiang, T; Gu, H i Zou, G. 2005. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 23(40):4844-4851.

Vidal, M; Cairó, JJ; Mateu, MG i Villaverde, A. 1991. Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C1 in *E. coli*: effect on bacterial cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35(6):788-792.

Vila, Pau. 2001. Enginyeria metabòlica de cèl·lules d'*E.coli*. Efecte sobre el creixement, el consum de glucosa i la secreció de subproductes. Tesi Doctoral: Universitat Autònoma de Barcelona.

Wilms, B; Hauck, A; Reuss, M; Sylatk, C; Mattes, R; Siemann, M i Altenbuchner, J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol.Bioeng.* 73(2):95-103.

**7. DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA DE**  
**CULTIU BASAT EN *Pichia pastoris*, I  $\beta$ -**  
**galactosidasa COM A PROTEÏNA MODEL.**



## **7.1. Introducció.**

La naturalesa dels llevats permet afirmar que aquests organismes mantenen una certa equidistància entre la resta d'organismes presentats fins al moment en el present treball. El llevat pertany grup dels organismes eucariotes, organismes més complexos que els procariotes. Dins d'aquest grup, és un organisme que és capaç de créixer en ambients amb menys restriccions que no pas la majoria dels organismes del seu grup, com les cèl·lules de mamífers o les d'insecte, permetent condicions de cultiu més agressives pel que fa a l'agitació i a l'aeració, ja que poden suportar condicions de cultiu més extremes. L'equidistància entre els altres dos grups d'organismes presentats també es manté tant a nivell de la velocitat de creixement, o temps de duplicació, així com en el cost dels medis de cultius.

Els llevats metilotròfics, de manera similar a l'*Escherichia coli*, no necessiten de medis complexos per al seu creixement, sinó que els cultius es poden desenvolupar en un medi amb presència de font de carboni, font de nitrogen i amb alguns micronutrients essencials com algun mineral i vitamines. En referència a les fonts de carboni, són uns organismes que poden créixer en una àmplia varietat de substrats diferents, com la glucosa, el glicerol, el sorbitol i el metanol entre d'altres. La metabolització del metanol és possible gràcies a la capacitat de sintetitzar alcohol oxidasa (OAX). Com ja s'ha explicat al capítol on s'han intentat construir les soques de *Pichia pastoris* per a expressar la VP2, aquesta característica s'aprofita pel disseny dels vectors d'expressió que empren el promotor fort de l'OAX. No obstant, a l'hora de dissenyar el procés de producció s'ha de tenir en compte que aquest promotor resulta fortament reprimat en presència d'altres fonts de carboni més fàcilment assimilables per *Pichia pastoris*, com la glucosa o el glicerol. Per tant, al moment d'induir el cultiu no hi podrà haver cap altra font de carboni al medi a part del metanol, i com s'explicarà més endavant, el canvi de font és aconsellable que compti amb un període d'adaptació del cultiu.

Com a característiques concretes del cultiu de *Pichia pastoris* en front d'altres tipus de llevats fermentatius, cal destacar el seu creixement en condicions de respiració aeròbica, permetent d'obtenir cultius de més alta densitat cel·lular, amb una velocitat específica de creixement superior a altres tipus de llevats.

Finalment, una característica important de *Pichia pastoris* que influeix sobre la definició de com s'han de desenvolupar les estratègies de cultiu, és que posseeix un sistema metabòlic equilibrat, que comporta una baixa o nul·la excreció de productes metabòlics d'oxidació

incompleta de la font de carboni, l'acumulació dels quals acostuma a ser tòxica per l'organisme, facilitant així el desenvolupament d'estratègies per a assolir cultius d'alta densitat cel·lular. Per altra banda, és un organisme que té una baixa excreció proteïnes natives al medi, bàsicament proteases i depèn dels substrats presents al medi, de manera que en aquells vectors que aportin la capacitat d'excreció de la proteïna d'interès al medi, facilitaran la seva recuperació i purificació.

### **7.1.1. Soca de *Pichia pastoris* seleccionada.**

Com ja s'ha comentat en el capítol anterior de resultats i discussió, la soca *Pichia pastoris* que s'escull per a desenvolupar el procés productiu en llevats, i del seu conseqüent anàlisi, és la soca comercial d' Invitrogen GS115, que incorpora el gen *Lac z* (que codifica per la  $\beta$ -galactosidasa, que és la proteïna model escollida donada la impossibilitat d'expressió de VP2 en aquest sistema de llevats) en el loci del gen HIS4, convertint-la en una soca histidina dependent.

Referent al seu fenotip destaca, a part de ser una soca His<sup>-</sup> i per tant no tenir la capacitat de sintetitzar la histidina, el fet de ser una soca Mut<sup>+</sup>, fet que li dota de la capacitat de seguir duplicant-se en presència de metanol com a única font de carboni, i per tant, és pot desenvolupar la inducció del cultiu i el seu creixement de manera simultània.

## **7.2. Desenvolupament de la metodologia per al cultiu de *Pichia pastoris*.**

El sistema d'expressió en *Pichia pastoris* parteix d'una situació molt diferent, donat que ha estat en gran mesura desenvolupat ja comercialment per la companyia propietària d'aquest sistema d'expressió, Invitrogen Co. (Cereghino i Cregg-2000). Aquest desenvolupament es basa en plasmidis que duen el promotor pOAX1 induïble per metanol, i ha dut a la pròpia empresa a invertir grans esforços per a desenvolupar no tan sols les diferents soques i plasmidis d'expressió, sinó a definir els medis de cultiu apropiats, així com les estratègies i sistemes de control necessaris per a desenvolupar processos productius emprant aquest sistema d'expressió. L'enfocament clarament aplicat d'aquesta aproximació ha dut a simplificar

al màxim aquest tipus de cultiu, i ha minimitzar els equips i costos de producció de proteïnes. Com que aquest objectiu és coincident amb el que es persegueix en aquest treball, es pot afirmar que gran part d'aquesta tasca ja ha estat realitzada i es pot procedir de forma bastant directa, així que només resta la implementació dels protocols descrits per la mateixa companyia (*Pichia fermentation process guidelines*, <http://www.invitrogen.com>) en el laboratori, adequar els canvis necessaris en el procés, i realitzar l'anàlisi (segona vessant d'aquest treball) que permeti comparar els diferents sistemes d'expressió escollits.

### 7.2.1. Medis de cultiu.

En primer lloc, es posen en pràctica les condicions recomanades per a efectuar aquest tipus de cultiu. En aquesta direcció es comparen dos medis de cultiu diferents: el FBSM, que és el medi definit que proposa la guia consultada per a als cultius en bioreactor, i el medi BMG, que és un medi semi-complex descrit per *Pichia pastoris* (Invitrogen-2001) que incorpora en la seva composició YNB (Yeast Nitrogen Base), un hidrolitzat que actua com a font de nitrogen. Ambdós medis es complementen amb 40 mg/L d'histidina.

Els cultius que es mostren a la Figura 7-1 es desenvolupen amb la soca GS115 en erlenmeyers de 500 ml de volum total i amb un volum de treball de 100 ml, i es cultiven en agitadors orbitals a 200 rpm i a una temperatura de 30 °C. La concentració d'inòcul és en els de 0,2 g/L.

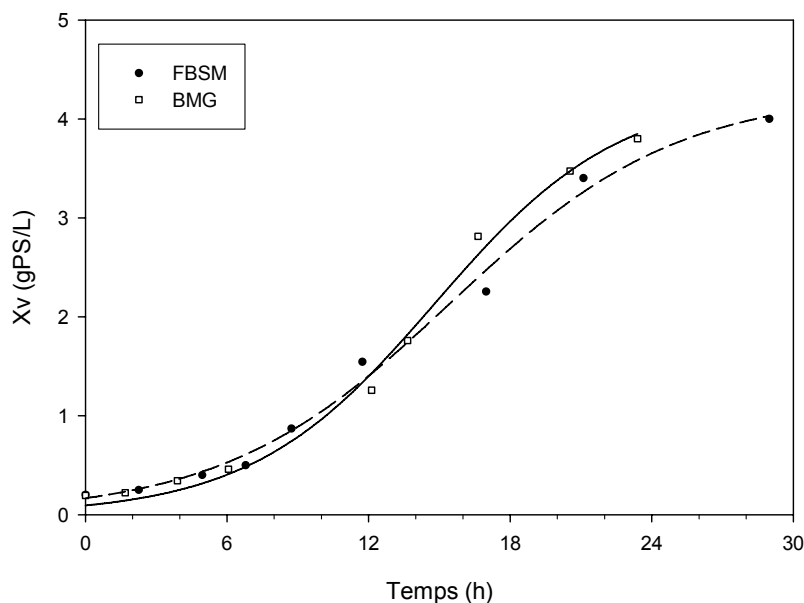


Figura 7-1: Perfil de l'evolució de la concentració cel·lular de la soca GS115 (lac z) en cultius en erlenmeyer, emprant els medis FBSM i BMG.



Com es pot observar, els dos perfils no presenten diferències destacables del comportament de la soca d'estudi, assolint-se valors propers a 4 g/L en el seu punt màxim. S'estudien altres paràmetres que descriuen el creixement de la soca en aquests medis, els resultats dels quals es mostren a la Taula 7-1. S'observa, que tant els valors dels paràmetres estudiats, la velocitat específica de creixement i la capacitat de producció cel·lular (rendiment biomassa-substrat), són molt similars. Per tant, s'opta per seguir el desenvolupament amb el medi per cultiu en bioreactor proposats per Invitrogen.

	Velocitat específica de creixement $\mu$ ( $h^{-1}$ )	Rendiment biomassa-substrat Y <sub>xs</sub> (g/g)
Medi FBSM + His	0,16	0,60
Medi BMG + His	0,17	0,50

---

Taula 7-1: Principals paràmetres, velocitat específica de creixement i rendiment biomassa-substrat, de creixement de la soca de *Pichia pastoris* GS115 (lac z), en els medis FBSM (Invitrogen) i BMG, suplementats ambdós amb histidina.

---

De cara a la realització de cultius d'alta densitat, a més del medi FBSM, cal disposar de dos medis més per tal de desenvolupar una estratègia en discontinu alimentat, i la inducció de l'expressió, que són els següents:

Els protocols consultats descriuen tres medis diferents necessaris per als cultius en discontinu alimentat:

- Medi FBSM per a la fase discontinua. La seva composició és bàsicament sals (fonts de S,P,Ca,Mg,K...), elements traça (font d'altres metalls Mn, Mo, Co, Fe... i biotina) i glicerol (font de carboni).
- Medi M-FB-G per a l' inici de la fase alimentada i l'adaptació al canvi de font de carboni, compostat per glicerol i elements traça.
- Medi M-FB-M per a la fase d'inducció, compostat per metanol i elements traça.

Els medis de cultiu per a desenvolupar l'estratègia en discontinu alimentat (proposats per Invitrogen) no duen histidina entre els seus components, ja que les construccions per a transformar les soques de *Pichia pastoris* que ofereix aquesta companyia, incorporen el gen de la histidina, de manera que dota a la soca transformada la capacitat de sintetitzar-se aquest aminoàcid elemental. Així, els medis amb absència d'aquest aminoàcid permeten realitzar la

selecció de la soca sense necessitat d'emprar antibiòtics. No obstant, la soca que s'empra per aquest treball no disposa d'aquesta capacitat, cosa que obliga a reformular els medis de cultiu, addicionant-hi la concentració de histidina necessària. En treballs de biologia molecular per a la construcció de les soques, es descriuen altres medis amb una composició de 40 mg/L d'histidina (Invitrogen·2001). Així doncs, s'addicionarà una concentració d'histidina de 40 mg/L en el medi de la etapa discontinua de creixement, el FBSM.

Per una altra banda, s'ha de calcular la concentració d'histidina necessària en el medi de l'etapa discontinua alimentada, on la concentració de font de carboni és molt major. Els càlculs és realitzen de dues maneres diferents. La primera, consisteix en mantenir la relació entre la quantitat d'histidina i de font de carboni del medi FBSM (amb 40 mg/L d'histidina), que equival a  $3,1 \cdot 10^{-3}$  g histidina/g glicerol. La segona, es calcula a partir de la composició genèrica dels organismes (Sanfeliu·1995), i en referència a la quantitat de substrat principal que es consumeix (a partir del rendiment biomassa-substrat, considerant com a font de carboni el glicerol).

$$0,596 \cdot \frac{\text{g.X (pes sec)}}{\text{g. Substrat}} \cdot \frac{50\text{g. proteïnes}}{100\text{g (pes sec)}} \cdot \frac{0,021\text{g. Histidina}}{1\text{g. proteïnes}} = 6,3 \cdot 10^{-3} \text{ gHis/gS}$$

Comparant el valor obtingut de manera estimada a partir de la composició, amb el valor que s'obté de la recepta dels medis de treball en laboratori, definits per a cultius en erlenmeyer, s'observa que l'estimada és el doble, segurament degut a l'ús dels valors més conservatius per a evitar una limitació del aminoàcid. Així doncs, s'haurà d'addicionar al medi M-FB-G una quantitat d'histidina de manera que mantingui la relació de  $6,3 \cdot 10^{-3}$  g histidina/g glicerol.

No obstant, el medi M-FB-M presenta l'inconvenient de que la histidina no és soluble, degut a l'alt contingut en metanol. Es proposa doncs com alternativa, carregar una elevada concentració d'histidina al medi inicial (FBSM), i realitzar posteriorment addicions manuals d'una solució de histidina concentrada, de manera que no es produeixi una limitació d'aquest aminoàcid, que poden ser calculades a partir del rendiment entre la histidina consumida i la quantitat de cèl·lules generada ( $1,05 \cdot 10^{-2}$  g histidina/gPS).

Per poder definir quina càrrega màxima es pot suplementar al medi de la fase discontinua, s'ha de conèixer dos factors: la capacitat de solubilització del substrat en el medi, i el possible efecte inhibitori que pot representar una elevada concentració d'un substrat. El

primer factor (límit de solubilitat) no afecta al medi de creixement, ja que la preparació del medi és a realitza a partir d'una solució 1000x d'histidina, fet que demostra la solubilitat d'aquesta en medi aquós, i per això es procedeix a realitzar l'estudi del possible efecte inhibitori al creixement de la soca degut a la concentració d'histidina.

L'efecte de la concentració d'histidina s'estudia en un experiment en erlenmeyers de 250 ml, amb un volum de treball de 50 ml, on s'addiciona histidina en un rang entre 0 i 400 mg/L, una concentració deu vegades superior a la proposada als protocols d'Invitrogen. Les condicions de cultiu dels experiments són d'una temperatura de 30°C i una velocitat d'agitació de 200 rpm. La Figura 7-2 mostra l'evolució de la velocitat específica de creixement en funció de la concentració d'histidina.

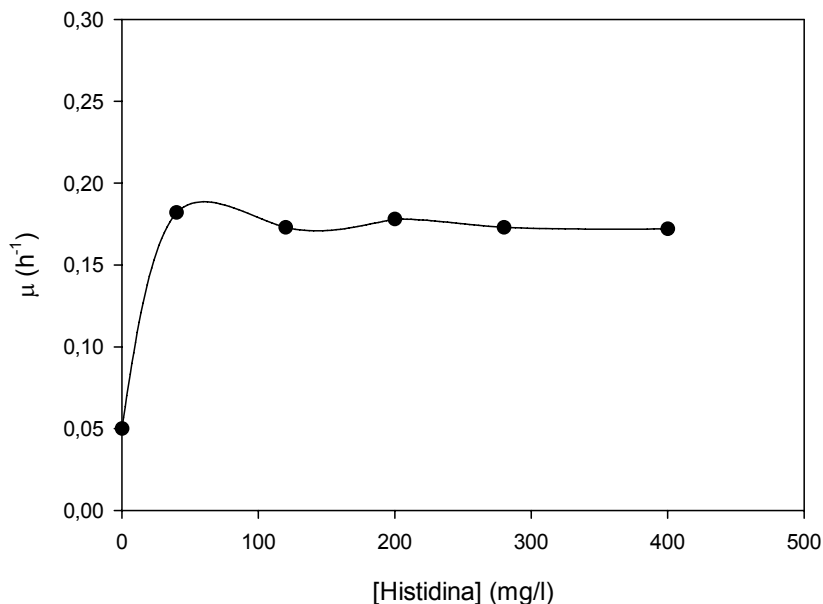


Figura 7-2: Efecte de la concentració d'histidina sobre la velocitat específica màxima de creixement de la soca de *P.pastoris* GS115 (*lac z*).

S'observa que en absència d'histidina afegida al medi de cultiu, la velocitat baixa fins a valors de 0,05  $h^{-1}$ , tot i que hauria de ser nul·la, però aquest valor pot ser degut a histidina intracel·lular residual, ja que en aquest cas només s'observa creixement en la fase inicial del cultiu. La resta de concentracions d'histidina mostren uns valors de velocitat específica de creixement molt similar per tot el rang de concentracions, del que es pot deduir que la histidina no mostra cap tipus d'inhibició en la soca GS155 de *Pichia pastoris*, dins del rang estudiat de fins a una concentració de 400 mg/L.

La conclusió d'aquest darrer experiment permet fixar per als cultius discontinus alimentats una concentració d'histidina en el medi de fermentació inicial de 400 mg/L, que pot suportar la formació de fins a de 40 grams totals de pes sec. Aquest valors impliquen que, una o dues addicions manuals addicionals d'histidina al llarg del cultiu haurien de resultar suficients per a suportar el creixement que es pot arribar a assolir.

### **7.3. Cultius d'alta densitat cel·lular de *Pichia pastoris*.**

#### **Cultius discontinus alimentats.**

Com ja s'ha comentat, el desenvolupament de cultius d'alta densitat cel·lular en el cas de *Pichia pastoris*, passa per una estratègia en discontinu alimentat, i per una fase final d'inducció de l'expressió de la proteïna recombinant per metanol. Cal tenir en compte que, el metanol pot tenir un efecte inhibitor sobre el creixement cel·lular i sobre l'expressió de la proteïna heteròloga, a uns nivell entre 8 i 10 g/L (Cos·2005b).

La guia d'Invitrogen planteja una transició de la fase discontinua, a la discontinua alimentada amb el següent protocol: s'inicia amb un període amb addicions de medi ric en glicerol a un cabal constant de 18,15 ml/L·h per tal augmentar la densitat cel·lular, i al acabar-se aquest, proposa l'inici de l'addició del medi ric en metanol a un cabal de 3,6 ml/L·h durant 2-4 hores. Posteriorment, es proposa un augment del cabal fins a 7,2 ml/L·h durant dues hores més, i finalment, s'augmenta fins a 10,9 ml/L·h.

No obstant, tot i aquesta informació facilitada per proveïdor, no es creu oportú realitzar la primera fase d'alimentació de medi amb glicerol, ja que la limitació d'aeració pot ser considerable i la demanda d'oxigen pur desmesurada, degut a les altes densitats cel·lulars que es poden assolir. Per altra banda, a la bibliografia s'indica que una fase de transició o d'adaptació del llevat a créixer amb el nou substrat és important per a garantir una bona expressió de la proteïna. Per tant, una addició de metanol de forma gradual permet una millor adaptació del cultiu a la nova font de carboni, en canvi una addició brusca, seguida d'una acumulació de metanol pot provocar una adaptació més lenta del cultiu, i fins i tot, la mort cel·lular. Alguns autors proposen estratègies d'alimentació creuada en la fase de transició, on s'alimenta un perfil decreixent de medi ric en glicerol i un perfil en augment d'addició de medi ric en metanol (Brierley *i col.*·1994; Sreekrishna *i col.*·1989).

En treballs consultats, defineixen estratègies d'alimentació controlades per l'etapa de discontinu alimentat amb medi ric en metanol, per tal d'aconseguir un nivell de producció òptim. En alguns casos s'ha treballat en llaços oberts de control, on s'ha emprat un model relacionant la velocitat específica de creixement, amb la velocitat de producció específica, cercant un valor de  $q_p$  òptim (Kobayashi *i col.*·2000). El perfil d'inhibició per substrat que presenta el metanol obliga a treballar a en unes condicions en que la velocitat de variació de la velocitat de creixement és molt pronunciada, i una petita variació de substrat pot variar dràsticament la velocitat específica de creixement i provocar la desestabilització del sistema. Altres autors han desenvolupat satisfactòriament estratègies de control de llaç tancat per a controlar la concentració de metanol al brou de cultiu, mantenint-la constant amb un bon nivell d'expressió (Cos·2005b; W Zhang *i col.*·2002). Tot i els bons resultats d'aquest tipus d'estratègies, els equips necessaris per a ser desenvolupades (espectrofotòmetre de masses o sensors de metanol), compliquen i encareixen molt el procés, i per tant aquest tipus d'opcions queden fora del tipus d'estratègies que es volen desenvolupar.

Així doncs, es proposa com a estratègia per a desenvolupar els cultius en discontinu alimentat la metodologia similar a la d'Invitrogen, abans descrita, però canviant la fase d'adaptació esglaonada, a una fase d'adaptació o transició entre la fase de creixement i la fase d'inducció, moment que es produeix el canvi de la font de carboni. Aquesta estratègia ha de permetre una millor i més ràpida adaptació al canvi de font de carboni.

L'estratègia de cultiu consisteix, doncs, en iniciar el cultiu en discontinu amb una forta càrrega de font de carboni (glicerol 40 g/L), que a part de reprimir l'expressió del gen, suporta un creixement de biomassa considerable (superior a 20 g/L). El medi descrit per l'etapa discontinua de creixement (FBSM) és un medi altament àcid, degut a la presència d'una gran quantitat d'àcid fosfòric. El pH del medi de cultiu es corregeix amb  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  al 25 %, assegurant així una disponibilitat suficient de la font de nitrogen. Tampoc s'han descrit efectes inhibitoris en el creixement degut a l'amoníac. Un cop assolida aquesta concentració cel·lular, s'inicia la fase de transició del canvi de font de carboni, passant de glicerol a metanol, que es la fase més crítica per a assegurar una bona inducció del cultiu. Finalment, aconseguida l'adaptació del cultiu a la nova font de carboni, només resta prosseguir amb les addicions del discontinu alimentat fins al final del cultiu. Els detalls de com es desenvolupa aquestes dues fases es discuteixen a continuació.

Els cultius es realitzen en un bioreactor de 2 litres de volum, a una temperatura de 30°C i un pH de 5,5. La variació de pH, degut a que no hi ha subproductes importants generats per l'organisme, serà causada per la disminució d'amoní al medi de cultiu, ja sigui per consum o

per evaporació provocada per l'aeració, i per a poder mantenir el pH s'empra com a base  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  al 25 %, que permet mantenir la concentració de la font de nitrogen al cultiu. El volum de medi inicial del fermentador és d'un litre, al qual se li afegeix el volum de l'inòcul de 200 ml, i els corresponents volums de medi d'addició fins a assolir un volum al voltant dels dos litres al final de la fermentació. L'inòcul es prepara en medi BMG, ja que és un medi més ric i fàcil de manipular (sobretot per la no necessitat de corregir el seu pH), en un erlenmeyer d'un litre de volum.

El nivell d'oxigen dissolt es manté en el rang de 40-50% de saturació, mitjançant un cabal d'aire que varia segons la fase del cultiu entre 0,5 i 3 l/min (0,38 i 2,3 vvm), i una variació de la velocitat d'agitació entre 300 i 1000 rpm amb un agitador de disc de pales planes. Finalment, s'equipa una línia auxiliar per a enriquir el flux d'aire a l'entrada del bioreactor amb oxigen, arribant a un màxim del 40% en la mescla de gasos. La peculiaritat de l'acció sobre els mecanismes d'aeració és la consignació dels paràmetres inicials, que es varien manualment i progressivament al llarg de la fermentació segons els requeriments de l'organisme. Aquesta acció es justifica per a poder establir un control d'addició de substrats en una estratègia de  $\text{pO}_2$ -stat. Aquesta estratègia consisteix en establir unes consignes d'agitació, aeració i %  $\text{O}_2$ , que assegurin durant un període de temps prou ampli un nivell de  $\text{pO}_2$  en el rang del 40-45%. Si el valor de  $\text{pO}_2$  supera aquest valor, indica una aturada de respiració deguda a un exhauriment del substrat, moment en que el control en cascada acciona la bomba l'addició de substrat. Al adicionar-se el substrat, la respiració es recupera i es reflexa en una baixada del valor de  $\text{pO}_2$ . Els valors de consigna dels paràmetres d'aeració es modifiquen quan, degut a la forta activitat metabòlica, el valor del  $\text{pO}_2$  disminueix per sota del 10%.

La Figura 7-3 mostra els valors tant de les consignes dels paràmetres de l'aeració que es modifiquen manualment, com del valor del  $\text{pO}_2$  que evoluciona lliurement per un experiment determinat (en concret el que es descriu posteriorment a la Figura 7-7). Els primers pics de  $\text{pO}_2$  que s'observen en la fase discontinua, corresponen a augments manuals de l'aeració (agitació i cabal d'aeració). A les 25 hores de cultiu s'observa un augment de  $\text{pO}_2$ , degut a l'exhauriment del glicerol, per tant correspon al final de la fase discontinua. En aquest punt, s'observen oscil·lacions de l'oxigen dissolt degut a l'entrada en funcionament de la fase alimentada del  $\text{pO}_2$ -stat, amb un valor de consigna del 90%, alimentant medi amb glicerol per a mantenir actiu el cultiu mentre s'engega la fase d'adaptació de canvi de font de carboni. Aquest alt valor de  $\text{pO}_2$ -stat és degut a que no es pretén augmentar la concentració de cèl·lules, i assegurar l'absència d'addicions errònies per alguna alteració puntual.

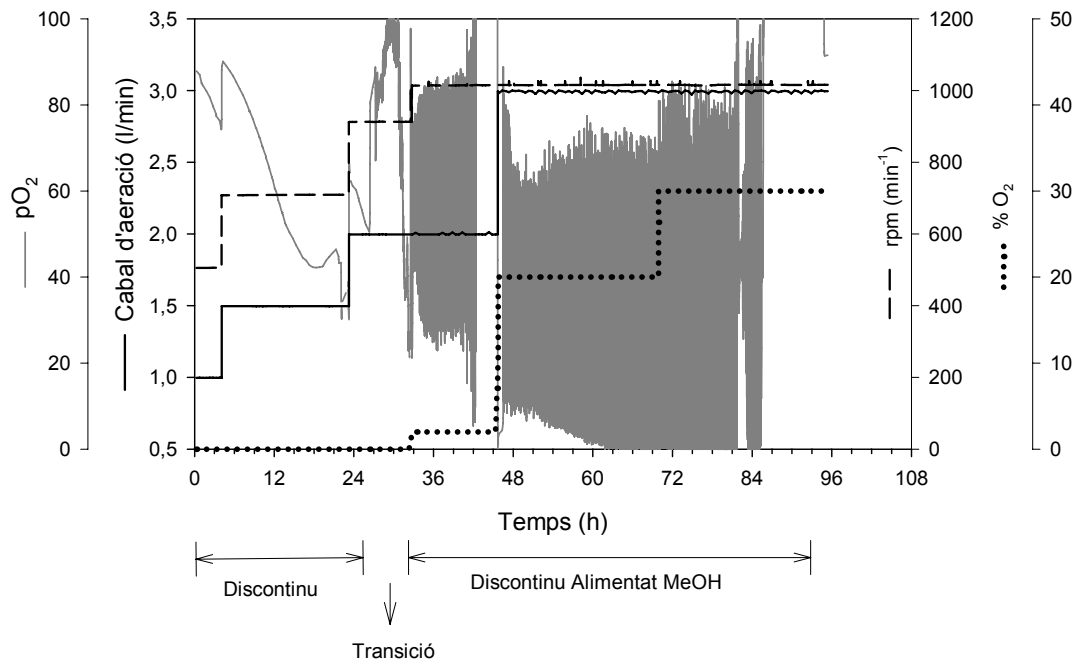


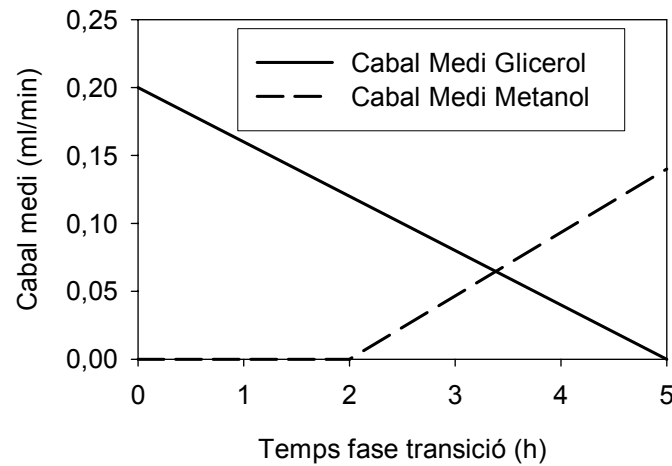
Figura 7-3: Exemple de l'aplicació de l'estratègia de pO<sub>2</sub>-stat en el cultiu discontínu alimentat de *P.pastoris* GS115. Es mostra la variació dels valors del cabal d'aeració, percentatge de saturació d'oxigen dissolt, i agitació, fixats manualment al llarg de les diferents fases del cultiu, per a aconseguir l'evolució desitjada de la pO<sub>2</sub> al cultiu. Dades corresponents a l'experiment descrit a la Figura 7-7.

A les 27-28 hores es produeix la fase de transició de font de carboni, període d'addicions prefixades, i per tant el pO<sub>2</sub>-stat és anul·lat. Aquest període dura 5 hores, i durant aquesta fase, el pO<sub>2</sub> assoleix valors elevats (superiors al 80% de pO<sub>2</sub>) indicant una aturada del metabolisme de l'organisme degut a una limitació de glicerol i l'addició de metanol, substrat al que s'han d'adaptar. Aquesta adaptació del metabolisme al metanol (MeOH), es manifesta amb un descens sobtat del pO<sub>2</sub>, que indica la recuperació d'una alta activitat metabòlica.

En aquest moment, a les 32-33 hores es consigna un nou pO<sub>2</sub>-stat per a l'addició de MeOH, amb un valor d'oxigen dissolt del 45%. A partir d'aquest moment, l'oscil·lació de la mesura d'oxigen indica que l'estratègia alimentada funciona correctament, addicionant medi amb MeOH cada vegada que la mesura d'oxigen supera el 45% de saturació. Com s'observa a la Figura 7-3, la dinàmica tant de consum d'oxigen, com les aturades del metabolisme són notòriament ràpides. Durant aquesta fermentació hi ha un període de tres hores entre les 42 i les 45, que hi ha un problema d'addició de medi degut a la colmatació del filtre de sortida de gasos. Aquest sistema permet doncs detectar anomalies al cultiu.

A continuació es descriuen dues fermentacions que s'han dut a terme emprant la metodologia descrita en l'apartat anterior.

Com s'ha comentat, l'estratègia dels cultius discontinus alimentats inclouen una fase de transició, en la que el cabal de medi amb glicerol es va disminuint de forma lineal, partint d'un cabal inicial de 18,5 ml/L·h (per un volum inicial de 1,2 litres, li correspon uns 0,4 ml/min) fins a zero en un període de cinc hores. Pel contrari, a partir de les dues hores del inici del decrement del cabal de glicerol es comença a alimentar medi ric en metanol, d'una forma linealment creixent fins arribar a un cabal de 0,13 ml/min, com es mostra a la Figura 7-4.



---

Figura 7-4: Perfils dels cabals d'addició dels medis de glicerol i de metanol en la fase d'adaptació o transició del cultiu en discontinu alimentat de *P. pastoris* GS155 que es mostra a la Figura 7-5.

---

El perfil d'addició de metanol s'ha definit a partir de la concentració inhibidora de metanol descrita en la bibliografia (Cos-2005a; W Zhang *i col.* 2002), de manera que el sumatori de tota l'addició realitzada equival a una sola addició puntual per a aconseguir aquesta concentració al fermentador. Els perfils que han estat consignats a la Unitat de Control Digital que comanda el fermentador es mostren a la Figura 7-4.

El primer dels cultius en discontinu alimentat amb la soca de *Pichia pastoris* GS115 es presenta a la Figura 7-5. Després de la inoculació i una curta fase de latència, s'assoleix una concentració cel·lular de 20 g/L (pes sec) al final de la fase en discontinu, moment en que s'inicia la fase de transició.



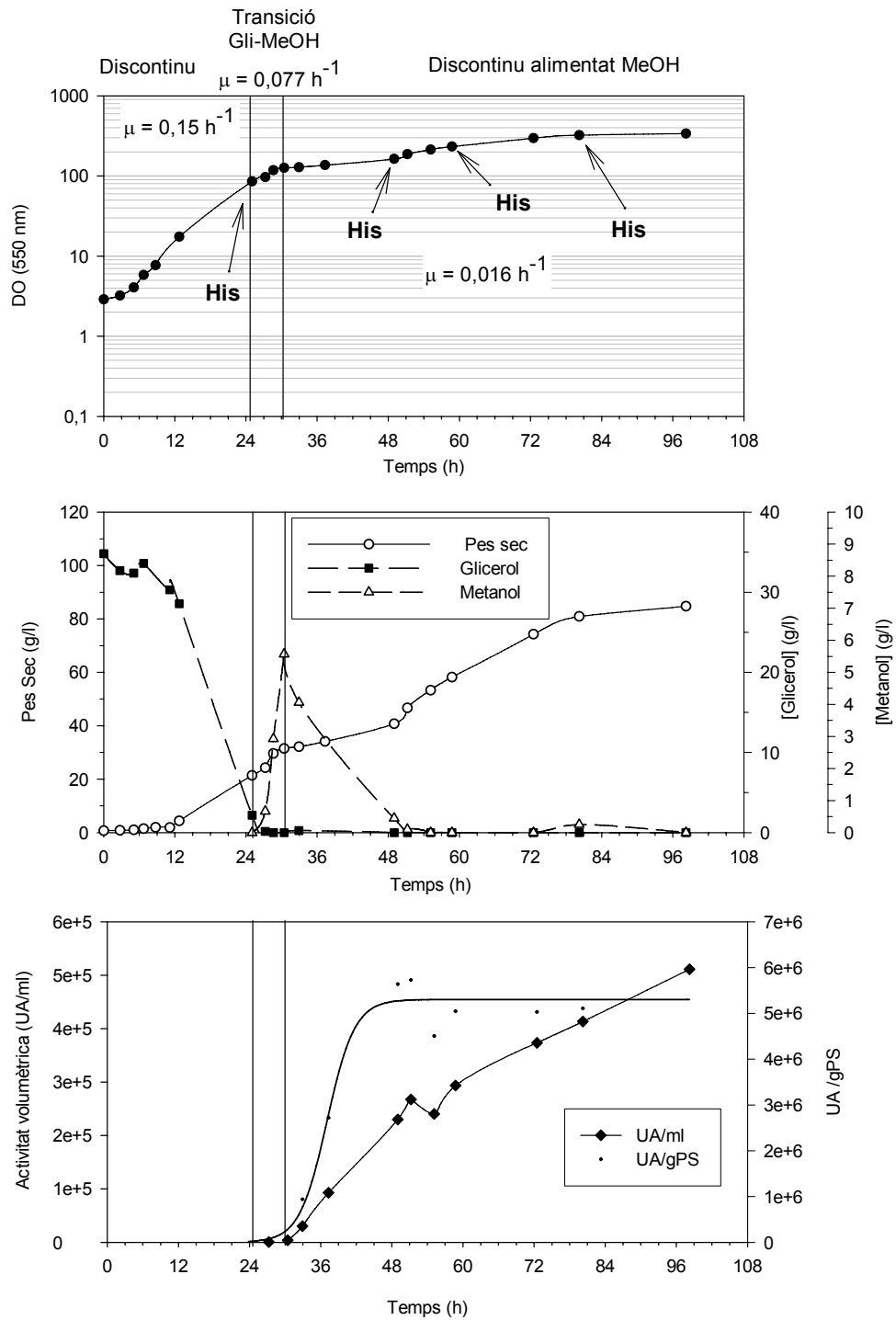


Figura 7-5: Resultats del cultiu discontinu alimentat de *Pichia pastoris* GS115, amb tres fases diferents: fase de discontinu amb glicerol, fase transició glicerol+metanol, i discontinu alimentat de metanol. La última etapa es realitza amb limitació de metanol, i l'addicció es realitza mitjançant la tècnica del  $pO_2$ -stat. Les figures mostren la velocitat específica de creixement (a dalt), l'evolució de la concentració de glicerol, metanol i concentració cel·lular (al mig), i activitat específica i volumètrica (a baix) amb el temps. Les addicions de la solució concentrada d'histidina estan indicades amb sagetes.

La velocitat específica de creixement durant la fase discontinua ha estat de  $0,15 \cdot h^{-1}$ , que disminueix a la meitat  $0,077 \cdot h^{-1}$  a causa de la limitació de glicerol i el canvi de font de carboni. Durant la fase de transició, la limitació de glicerol és reflexa en el seu valor de concentració residual nul, i a mesura que la fase avança es produeix una acumulació de metanol. Aquesta acumulació de metanol és deguda a que encara el mecanisme d'assimilació del metanol per part de l'organisme no s'ha activat totalment. La concentració de metanol al final de la fase de transició és lleugerament superior a 6 g/L, que són assimilats en unes 20 hores de cultiu, moment on es comença l'addició de metanol en la fase discontinua alimentada controlada amb  $pO_2$ -stat consignat al 50% de  $pO_2$ . Aproximadament en aquest instant, a les 50 hores de cultiu, s'observa un lleuger increment de la velocitat específica de creixement, indicant que l'organisme ja s'ha adaptat al metanol com a única font de carboni. A partir d'aquest moment, la concentració de metanol es propera a zero degut a l'estratègia de limitació de metanol del discontinu alimentat, evitant-se una acumulació del metabòlit que pogués ser inhibidora. Al llarg del cultiu s'han realitzat addicions puntuals de la solució d'histidina amb un còmput total de 40 ml, repartides al llarg de la fase de transició i discontinua alimentada, representades amb sagetes a la Figura 7-5.

En aquestes condicions de la fase de transició, el cultiu necessita unes 24 hores d'inducció per a arribar a estabilitzar la producció específica de producte (UA/gPS), i a partir d'aquest moment es manté constant, per tant es pot afirmar que el cultiu ha estat totalment induït. A partir d'aquest moment, l'augment de concentració volumètrica de producte és deguda a l'augment de concentració cel·lular.

Al final del cultiu s'assoleix una concentració cel·lular superior a 80 g/L, i una concentració volumètrica de producte de  $5 \cdot 10^5$  UA/mL, amb una productivitat volumètrica de 5000 UA/L·h i una productivitat específica ( $q_p$ ) de  $2,73 \cdot 10^5$  UA/gPS·h.

El següent bioprocés que es planteja afronta un triple objectiu: confirmar el desenvolupament i resultats de l'anterior, acabar d'ajustar els valors dels paràmetres de la fase de transició que permeti disminuir el temps d'adaptació de la soca al canvi de font de carboni, podent disposar amb menor temps del cultiu creixent amb metanol i totalment induït, i fixar un valor de  $pO_2$  del 35% que regeixi el  $pO_2$ -stat, factors que han de permetre millorar la productivitat volumètrica del procés.

Els perfils creuats d'addició de glicerol i metanol és redefeixen, el de medi ric en glicerol a partir de la velocitat específica de consum de glicerol ( $q_{s(\text{glicerol})}$ ) que pren un valor de  $-0,12 \text{ gS/gPS}\cdot\text{h}$ , tal i com mostra la Figura 7-6 part superior, que es calcula a partir de dades preses en diferents intervals durant la fase discontinua de l'experiment anterior. El valor del cabal d'alimentació de medi ric en glicerol es calcula per a l'instant inicial com el cabal necessari per a no produir una limitació de substrat, i es disminueix linealment en un període de 5 hores, fins que es deixa d'alimentar.

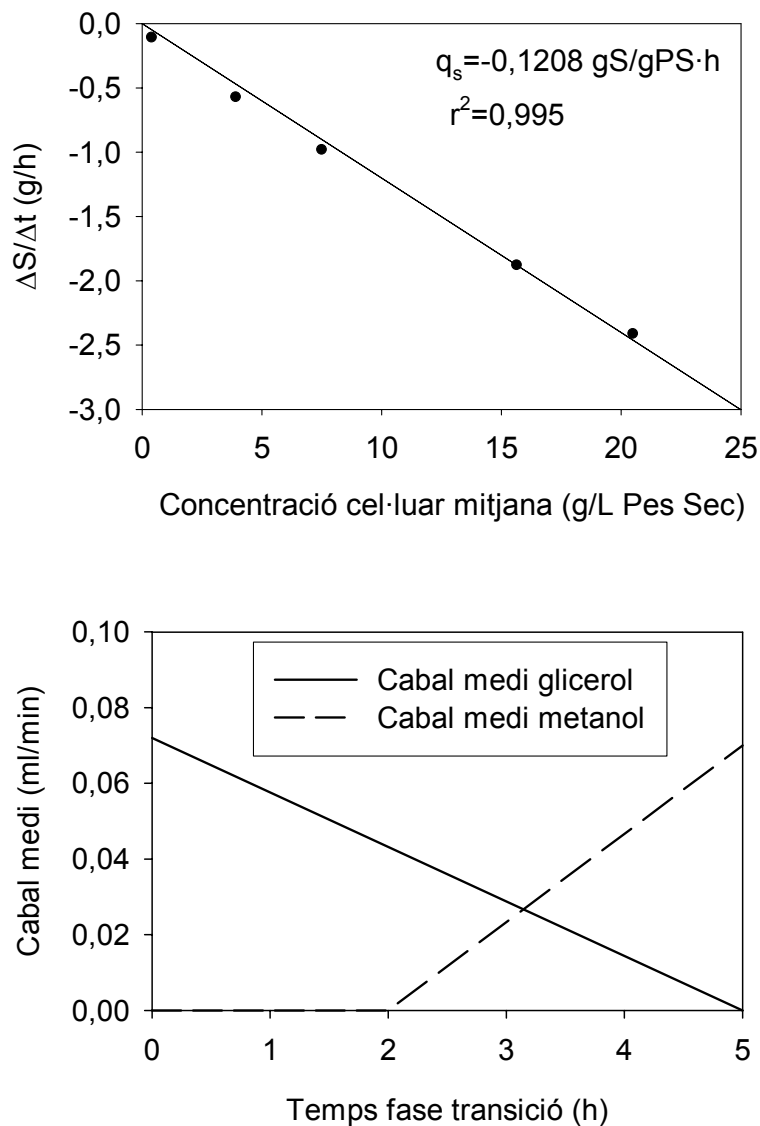


Figura 7-6: Part superior: Càlcul de la velocitat específica de consum de substrat (Glicerol) de la soca GS115. Part inferior: Perfils dels cabals d'addició dels medis de glicerol i de metanol en la fase d'adaptació o transició del cultiu en discontinu alimentat de *P. pastoris* GS155 que es mostra a la Figura 7-7

El perfil d'addició de medi ric en metanol en la fase de transició, segueix el mateix sistema de càlcul, però es disminueix la concentració de metanol total afegida al cultiu per a assolir una concentració de 5 g/L en comptes de 8 g/L. Els perfils d'addició del medi ric en glicerol (M-FB-G) i ric en metanol (M-FB-M) es presenten a la Figura 7-6 a la part inferior, i en comparació del perfil realitzat en la fermentació anterior, el cabal màxim d'addició es redueix fins a 0,7 ml/min, mantenint-se la resta de paràmetres.

El resultat del cultiu es mostra a la Figura 7-7, on s'observa un desenvolupament de la fase discontinua del procés molt similar a la descrita en el cas anterior, assolint una concentració cel·lular superior als 20 g/L, i una velocitat específica de creixement de  $0,16 \text{ h}^{-1}$ . A continuació s'inicia la fase de transició amb els nous perfils d'addició descrits. Els canvis introduïts en la fase de transició es reflecteixen, en primer lloc, en una disminució de la velocitat específica de creixement. Si en el cas anterior era de  $0,077 \text{ h}^{-1}$ , en el present cas disminueix fins a  $0,032 \text{ h}^{-1}$ , degut a la menor quantitat de glicerol addicionat en aquesta fase. Per una altra banda, l'objectiu que es perseguia era el de disminuir el temps d'adaptació del cultiu, reduint-se a unes 18 hores, en front de les 24 del cas anterior, tal i com es pot observar en el perfil de la producció específica de  $\beta$ -galactosidasa. Aquestes millores poden ser causades per dos motius principals, la menor addició de glicerol que força a l'organisme a iniciar l'adaptació amb més celeritat, i la menor concentració de metanol final a l'etapa de transició, que com ja s'havia comentat anteriorment, als estadis inicials d'adaptació del metabolisme una concentració elevada de metanol pot afectar el comportament de la soca de *P. pastoris*.

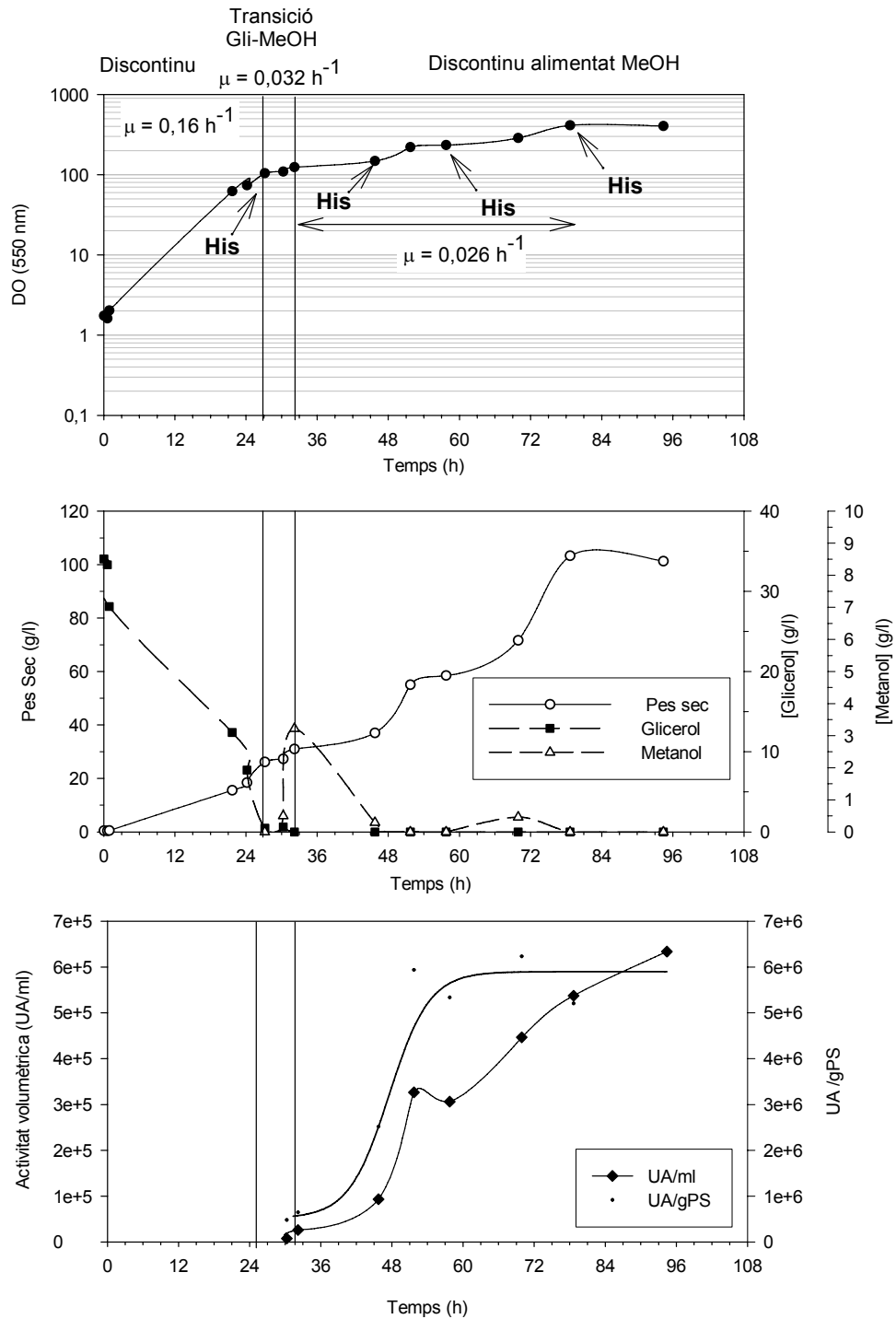


Figura 7-7: Resultats del cultiu discontinu alimentat de *Pichia pastoris* GS115, amb tres fases diferents: fase de discontinu amb glicerol, fase transició glicerol+metanol, i discontinu alimentat de metanol. La última etapa es realitza amb limitació de metanol, i l'addició es realitza mitjançant la tècnica del  $pO_2$ -stat. Les figures mostren la velocitat específica de creixement (a dalt), l'evolució de la concentració de glicerol, metanol i concentració cel·lular (al mig), i activitat específica i volumètrica (a baix) amb el temps. Les addicions de la solució concentrada d'histidina estan indicades amb sagetes.

L'últim canvi introduït en la fermentació ha estat el valor de consigna del  $pO_2$ -stat, que s'ha disminuït del 45% al 35%, reflectint-se en un lleuger augment de la velocitat específica de creixement global en la fase discontinua alimentada, passant de ser de  $0,016 \text{ h}^{-1}$  a  $0,022 \text{ h}^{-1}$ .

Aquest fet permet disminuir també el temps necessari de cultiu, i augmentar per tant la productivitat volumètrica donat que augmenta l'addició del medi de metanol a causa d'un ajustament del pO<sub>2</sub>-stat.

En aquestes noves condicions del bioprocés, s'ha obtingut uns valors de concentració cel·lular finals al voltant de 100 g/L, una concentració de producte (o activitat volumètrica) de  $6 \cdot 10^5$  UA/mL, i una productivitat específica similar a l'anterior cas de  $2,3 \cdot 10^5$  UA/gPS·h. Amb aquestes condicions s'ha pogut augmentar la productivitat volumètrica fins aproximadament 6500 UA/L·h.

Per tant, es pot considerar que l'estratègia desenvolupada per a realitzar cultius d'alta densitat cel·lular de *Pichia pastoris*, d'una manera relativament senzilla però eficient, evitant la inhibició per metanol i assolint alts nivells de concentració cel·lular, expressió de la proteïna, i productivitat. Aquest darrer cultiu serà el marc de referència per a l'estudi de l'anàlisi de procés en el cas del sistema de *Pichia pastoris*.

## **7.4. Bibliografia.**

Cereghino, JL i Cregg, JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev 24(1):45-66.

Cos, Oriol. 2005. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Bellaterra: Universitat autònoma de Barcelona.

Invitrogen. 2001. Pichia expression kit. Version F. Catalog no. K1710-01.

Kobayashi, K; Kuwae, S; Ohya, T; Ohda, T; Ohyama, M i Tomomitsu, K. 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feedings strategy. Journal of Bioscience and Bioengineering 90(3):280-288.

Sanfeliu, Anna. 1995. Producció d'anticossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona.

Zhang, W; Smith, LA; Plantz, BA; Schlegel, VL i Meagher, MM. 2002. Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. Biotechnol. Prog. 18:1392-1399.

**8. DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA DE  
CULTIU BASAT EN *E. coli*, I  $\beta$ -Galactosidasa  
COM A PROTEÏNA MODEL.**





## **8.1. Introducció.**

Les característiques citològiques, fisiològiques i metabòliques de l'*Escherichia coli* caracteritzen les condicions de cultiu i la metodologia a emprar en el seu desenvolupament i definició. L'*E.coli* disposa d'una estructura interna senzilla, com la resta de cèl·lules procariotes, i no presenta ni compartimentalització interna, ni cap tipus d'òrgans, simplement una membrana citoplasmàtica i una paret cel·lular que l'hi ofereix una resistència a les condicions ambientals major, per exemple, que les cèl·lules animals. Aquest fet comporta que es pugui cultivar en condicions més agressives suportant velocitats d'agitació i cabals de bombolleg més elevats, fet que repercuteix en un augment de la capacitat de transferència d'oxigen al medi de cultiu, i per tant, en l'assoliment de concentracions cel·lulars elevades. Una altra de les avantatges és l'alta velocitat de creixement del bacteri, que suposa un escurçament del temps de cultiu que influeix en un abaratiment del procés productiu.

Posseeix un metabolisme aerobi facultatiu, pot metabolitzar la glucosa i la lactosa, per citar les dues fonts de carboni més habituals en que es cultiven, entre l'extens conjunt que és capaç de metabolitzar, tant en presència com en absència d'oxigen. Contràriament a altres organismes eucariotes i procariotes, no requereix de medis de cultiu molt complexos, ni de la disponibilitat de molècules complexes, ja que disposa de la capacitat de sintetitzar-les a partir d'elements més simples com l'aigua, una font de carboni (que actua alhora com a font d'energia), una font de nitrogen, i concentracions traces de minerals i metalls com el Fe, S, Mg, Na, K, Ca, Co... (Gottschalk-1979). Aquestes característiques permeten un fàcil cultiu al laboratori, podent-se utilitzar medis simples i definits, que després facilitin el disseny d'estratègies de cultiu per a l'obtenció de cultius d'alta densitat.

L'*E.coli* ha estat utilitzada a nivell industrial, primerament en la producció d'un ampli espectre d'enzims, i posteriorment en la producció de proteïnes recombinants per a l'ús terapèutic humà (com les interleuquines 1,2 i 3 (antitumorals), factor d'alliberament de l'hormona de creixement, urokinasa (anticoagulant)... ) (Vila-2001). No obstant, depenent de l'ús i la via d'administració, aquests tipus de proteïnes requereixen de processos de purificació exhaustius per a evitar respostes immunitàries adverses de l'organisme receptor, humà o animal, degut a la presència d'endotoxines provinents del bacteri.

Les soques que s'utilitzen en el present treball són M15 prep4 transformades amb el constructe pTCO46- $\beta$ gal (induïble per IPTG), i pJCO46- $\beta$ gal (induïble per temperatura).

## **8.2. Estudis previs pel desenvolupament d'estratègies de producció en bioreactor.**

### **8.2.1. Elecció del medi de cultiu.**

Els medis de cultius per a bacteris es poden agrupar en tres grups principals:

- Medis complexes: utilitzen extractes (normalment de llevats), la composició del quals no es coneix exactament i pot variar segons el lot de producció, o el proveïdor. Són medis àmpliament emprats per tasques de laboratori, en l'àmbit de l'enginyeria genètica i molecular en el procés de construcció de la soca d'interès. No són recomanables per a processos productius on es pretengui desenvolupar estratègies de cultiu d'alta densitat, bàsicament, per la dificultat de conèixer i seguir la concentració dels substrats que s'estan emprant, i per ser medis generalment no equilibrats.
- Medis semicomplexes: Similars als anteriors, però usen un font de carboni principal coneguda, i els extractes acostumen a ser complements del medi, o fonts de carboni secundàries.
- Medis definits: són medis de composició i concentració de substrats coneguda, característica que permet desenvolupar estratègies de cultiu més complexes per a l'obtenció de cultius d'alta densitat. Dins d'aquest grup també hi ha els medis anomenats mínims, que contenen només els elements essencials per al creixement cel·lular i l'expressió de les proteïnes d'interès.

En el cas de cultius bacterians, la importància del medi cultiu no recau tant en el cost que representa (com era en els casos de cultius cèl·lules animals), sinó en les possibilitats que ofereixi el medi de desenvolupar estratègies de cultiu d'alta densitat cel·lular de manera controlada. Per aquest motiu, es realitza en primer lloc una búsqueda d'un medi de cultiu definit que ofereixi un rendiment similar als medis complexes. Es comparen els creixements de la soca en diferents medis definits, com el MD (Yee i Blanch·1993) i el M9 (suplementats amb 50 mg/L de tiamina), i per a poder avaluar el resultat es compara també amb el creixement en

un medi clàssic complex, el medi LB (Maniatis i col., 1982). Les composicions detallades dels medis es poden trobar en l'apartat de Materials i Mètodes.

La sèrie experimental es realitza en erlenmeyers de 250 ml amb un volum de treball de 50 ml, a 37°C i una velocitat d'agitació de l'orbital de 200 rpm. Els inòculs provenen de cultius crescuts també en erlenmeyer, i la concentració cel·lular inicial és aproximadament de 0,15 g (pes sec)/L. Els resultats dels cultius de la soca pTCO46- $\beta$ gal es mostren a la Figura 8-1. S'observen que els perfils assolixen una densitat cel·lular similar, aproximadament de 1,7 g/L en el medi MD, de 1,52 g/L en el M9 i de 1,4 g/L en el medi LB. En els casos del creixement en medi definit (MD i M9), sembla que hi hagi una petita fase de latència

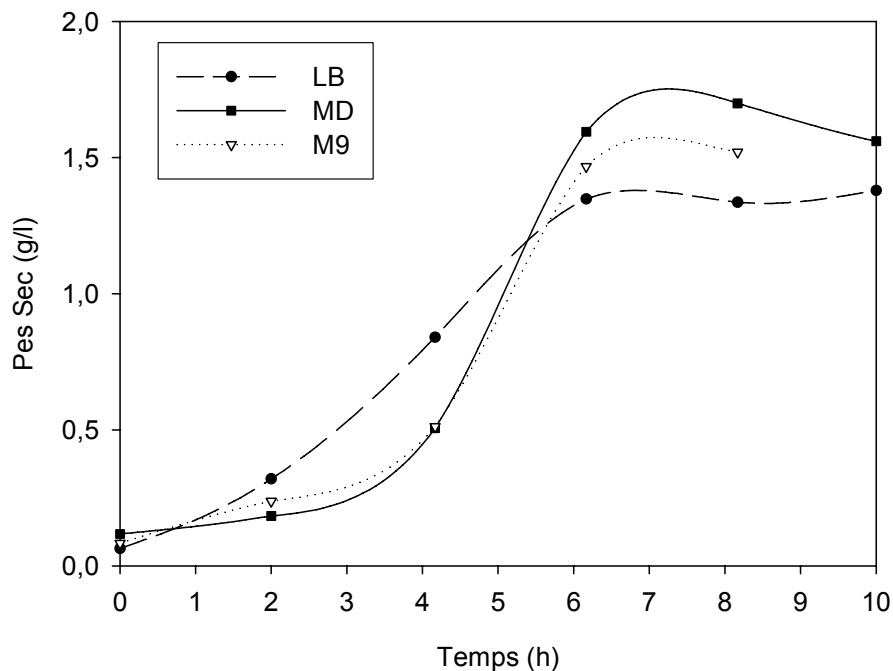


Figura 8-1 Cinètica de creixement de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal, per a diferents medis de cultiu: Medi complex LB, i els medis definits MD i M9 (ambdós amb tiamina 50 mg/L)

A partir de les dades dels perfils de creixement dels diferents casos, es poden calcular les velocitats específiques màximes per a cada cultiu, a partir de l'aplicació del balanç de matèria per la concentració cel·lular en un cultiu en discontinu. Els valors dels paràmetres de les diferents regressions es recullen a la Taula 8-1, on el pendent de la recta de regressió correspon al valor de la màxima velocitat específica de creixement.

Observant els gràfics, i analitzant els perfils i les velocitats específiques de creixement es pot afirmar que, els medis definits explorats no presenten limitacions respecte el creixement en medi ric (complex). El valor de les velocitats específiques màximes de creixement són del mateix rang, igual que la densitat final dels cultius assolida.

Medi de cultiu	LB	MD + tiamina	M9 + tiamina
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,49	0,51	0,45

---

Taula 8-1: Recull dels paràmetres de les regressions lineals efectuades en l'experiment de medis de cultiu, per a calcular la velocitat específica màxima de creixement de la soca per diferents medis de cultiu.

---

El medi finalment escollit és el medi MD, ja que ofereix una velocitat específica de creixement lleugerament superior respecte el medi M9, i la concentració final que s'assoleix és també lleugerament més alta. A nivell pràctic, la complexitat de la seva elaboració no és gaire diferent del medi M9, tot i que tingui més components, i els corresponents preus tampoc no difereixen gaire.

## **8.2.2. Estudi metabòlic i fisiològic de la soca de *E.coli* M15.**

### **Cultiu en discontinu en bioreactor.**

Una vegada el medi de cultiu ja ha estat escollit, per a poder descriure quines són les seves limitacions tant a nivell de creixement del biocatalitzador, com del comportament metabòlic i fisiològic que descriu l'organisme, és aconsellable realitzar cultius en bioreactor per a poder estudiar i caracteritzar els substrats consumits, així com els metabòlits resultants del metabolisme, ja que aquest sistema, a diferència dels cultius en erlenmeyers, no presenten tantes limitacions per a garantir una concentració d'oxigen dissolt determinada i constant, i per tant evitar alteracions en el metabolisme bacterià.

En Figura 8-2 es mostra el cultiu en discontinu realitzat en un bioreactor de 2 litres, amb un valor de consigna de pO<sub>2</sub> del 40% (emprant un control en cascada de l'agitació en un rang entre 200 i 800rpm, i juntament amb polsos d'aeració), i un pH de 7. Es realitza el

seguiment de la concentració cel·lular (en unitats de pes sec), el substrats principals (glucosa com a font de carboni i amoni com a font de nitrogen) i el subproducte principal (àcid acètic).

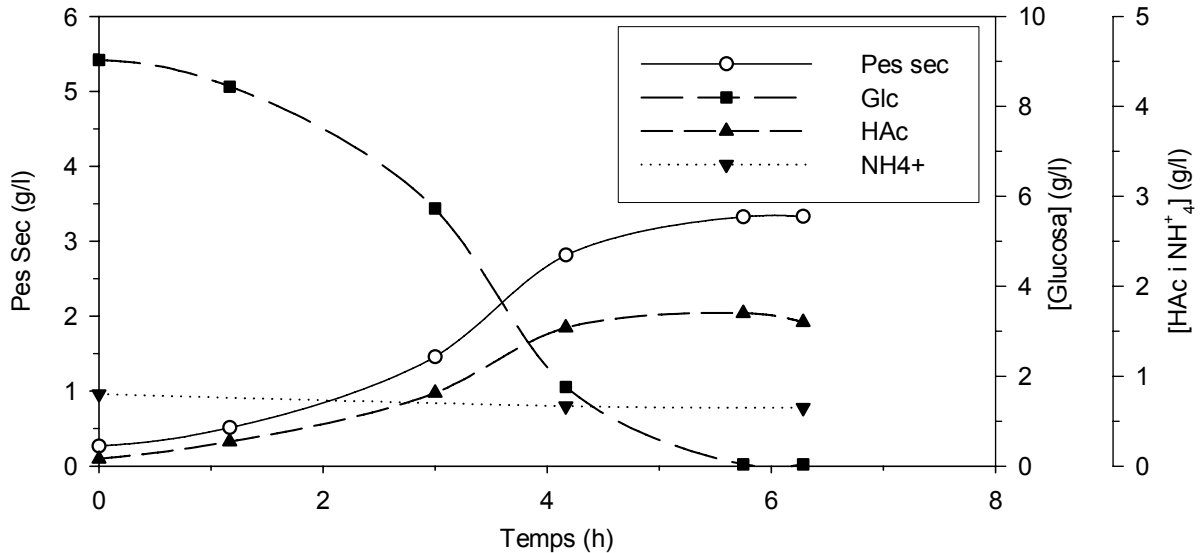


Figura 8-2: Cultiu en bioreactor de 2 litres i en estratègia discontinua de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal en el medi de cultiu MD. Perfils de concentració cel·lular en pes sec (○), de glucosa (■), d'acetat (▼) i d'amoni (▲).

Com es pot observar, el medi MD emprat (amb 10g/L de glucosa inicial), permet assolir una concentració final de cèl·lules de 3 g/L, fins que s'atura el creixement en el moment en què s'esgota la font de carboni. La Taula 8-2 mostra els valors dels principals paràmetres que s'han calculat a partir de les dades obtingudes del cultiu en la fase de creixement exponencial.

$\mu_{\max}$	$0,56 \text{ h}^{-1}$
$Y_{XS}$	0,344 g Pes Sec/ g Substrat consumit
$Y_{HAc-S}$	0,205 g Acètic produït/ g Substrat consumit
$Y_{Amoni-S}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$ g Amoni consumit / g Substrat consumit

Taula 8-2: Principals paràmetres cinètics i de rendiments obtinguts en el creixement en discontinu de la soca *d'E.coli* M15 pTCO46- $\beta$ gal en medi MD.

El perfil de l'evolució de la concentració d'amoni mostra un lleuger descens, des d'una concentració inicial aproximadament de 0,8 g/L, fins a una concentració de 0,6 g/L al final del cultiu. Com ja és conegut, l'amoni tot i ser essencial pel creixement de les cèl·lules, té un requeriment d'aproximadament cinquanta vegades inferior al de la glucosa, però la

característica més important recau en la seva doble acció sobre el creixement. Per una banda és imprescindible com a font de nitrogen, però per altra banda és un dels substrats que indueixen més inhibició per toxicitat a elevades concentracions. Aquest fet condiona l'estratègia de com han de ser aportats els nutrients en els cultius, que serà estudiat i discutit més endavant en aquest capítol. Finalment, s'observa que el perfil de la concentració d'àcid acètic, que conforma el principal subproducte del metabolisme de l'*E. coli*, i que està lligat directament amb el consum i metabolització de la glucosa, creix amb una relació d'un 20% respecte la glucosa introduïda ( $Y_{HAc-S} = 0,205 \text{ g/g}$ ). L'acumulació àcid acètic juntament amb l'acumulació de l'amoni, han estat descrites com les dues causes principals que causen inhibició del creixement dels cultius d'*E.coli* (Luis Vidal-2006; Vila-2001).

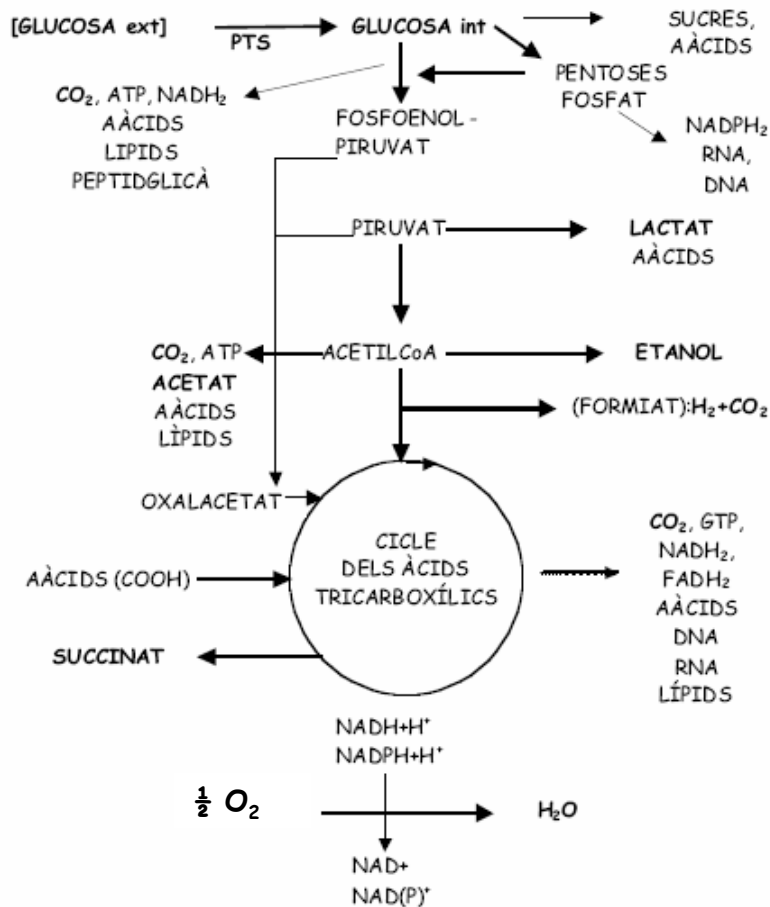


Figura 8-3: Esquema de les rutes metabòliques del bacteri *E.coli* on es recull les reaccions bioquímiques per a la síntesi de material cel·lular i l'expressió de proteïnes d'interès, com els mecanismes de generació d'energia. (Vila-2001)

L'àcid acètic es produeix com a subproducte del metabolisme de la glucosa, acumulant-se en el brou de cultiu al ser excretat per la soca bacteriana, com es pot observar en el quadre metabòlic mostrat a la Figura 8-3. La glucosa, després de ser transportada a l'interior de la cèl·lula, és degradada per la via de la glicòlisi a dues molècules de piruvat, que

és convertit posteriorment, per mitjà d'una deshidrogenació i descarboxilació, a AcetilCoA, alliberant-se en les primeres reaccions energia que és emmagatzemada per a la fosforilació de les molècules d' ADP a ATP. En aquest procés, per cada molècula de glucosa s'obtenen dues molècules d' ATP i dues de NADH<sub>2</sub> (que aporta poder reductor). Una vegada la glucosa ha estat degradada fins a AcetilCoA, una part d'aquest és incorporat al cicle delc àcids tricarbòxilics (CAT), que és la via metabòlica on s'assoleix la mineralització total de la font de carboni, obtenint-se com a subproductes CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, i aprofitant així al màxim l'energia associada a la molècula d'AcetilCoA. Al CAT, l'AcetilCoA cedeix un grup acetil a l'oxalacetat, convertint-se a citrat. Després de tot el conjunt de reaccions que conformen el CAT, en que s'obté poder reductor en forma de NADH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub> i GTP, la molècula de citrat es torna a convertir en una molècula d'oxalacetat, que a la vegada pot acceptar una altre grup acetil permeten tornar a fer girar el CAT. Els productes finals del CAT són el CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, i precursors de síntesi, poder reductor i 32 molècules de ATP per cada molècula de glucosa oxidada. Una part de les molècules de NADH<sub>2</sub> i FADH<sub>2</sub> generades s'utilitzen per a funcions de biosíntesis, però bàsicament són utilitzades per a regenerar enllaços fosfat rics en energia en el procés de fosforilació oxidativa, que té lloc en la cadena de transport d'electrons, mentre que l'acceptor d'electrons és l'oxigen molecular.

Per l'altra banda, no tot l'AcetilCoA que es genera a la via de la glicòlisi s'incorpora al CAT, i una part és desviada cap a la formació d'àcid acètic que és excretat de la cèl·lula. Aquesta biotransformació genera ATP, que és aprofitat per la cèl·lula, tot i que el rendiment que se'n extreu és molt inferior que l'oxidació en el CAT. Les condicions en que s'efectua el creixement de l'*E.coli* poden fer variar l'equilibri entre aquestes dues rutes, de forma que es produirà una major o menor acumulació d'àcid acètic en el brou de cultiu.

Aquest comportament s'ha observat en altres treballs. Així, en una anàlisi dels fluxos metabòlics de l'*E.coli* realitzada dins del mateix grup de recerca (Vila-2001) es va poder observar i quantificar que per cada 100 mmols de glucosa metabolitzats, només s'obtenen 118,36 mmols de piruvat (dels 200 estequiòmètrics que els hi correspondria), mentre que la resta es destinen a precursors de síntesi cel·lular. Per altra banda, la suma de tots els fluxos que participen en la síntesi de material cel·lular (considerant els principals precursors de biosíntesis G6P,R5P, G3P, PG, PEP,Pyr,AcetilCoA i OAA, i tenint en compte les relacions molars) un 54 % de la glucosa és convertida a cèl·lules.

El funcionament del CAT es basa en l'existència de dos punts d'entrada de metabòlits, un prové del PEP que no es transforma totalment a piruvat, sinó que també genera oxal-acetat (OAA). Per una altra banda, del piruvat format una part es destina a biosíntesi, i només



aproximadament la meitat de la glucosa introduïda inicialment arriba a AcetilcoA. L'entrada de AcetilcoA i de OAA en el cicle dels àcids tricarboxílics, ha de ser estequiomètrica, per tant aproximadament una tercera part de l'AcetilcoA pot ser introduït al CAT, mentre que de la resta, una part es destina a precursors de síntesi i l'altra es expulsat en forma d'acetat. Aquestes vies de metabolització de la glucosa, i de l'excreció de l'acetat ha estat recollit en diversos models metabòlics (Holms·1996).

## **Efecte de les concentracions de metabòlits en el creixement d'*Escherichia coli*.**

Prèviament a la definició de l'estratègia d'addició de nutrients per a cultius d'alta densitat, és necessari descriure els efectes de les concentracions de nutrients i subproductes, així com de les condicions de cultiu, per a determinar els marges en que les concentracions d'aquests elements esdevindran inhibidores per la soca de treball.

Es plantegen una sèrie d'experiments amb l'objectiu d'estudiar l'efecte de les concentracions de metabòlits en el creixement, a partir de l'anàlisi de les velocitats específiques màximes de creixement de la soca en qüestió. Es preparen diferents erlenmeyers amb medi MD on s'afegeix diferents concentracions del metabòlit d'estudi, i es calcula la velocitat de creixement màxima en la fase de creixement exponencial de la soca, garantint així que la limitació del cultiu no serà produïda per una possible limitació d'algun substrat o per limitació d'oxigen dissolt en el sistema.

Els diferents metabòlits o substrats, i les seves concentracions que han estat referenciats com a principals causants d'inhibicions dels cultius d'*E.coli* són: glucosa (50 g/L), amoni (3 g/L), acetat (5 g/L), magnesi (8,7 g/L), fòsfor (10 g/L) i ferro (1,15 g/L) (Riesenberg·1991; Riesenberg *i col.*·1991). En el present cas, i emprant com a criteri la demanda dels metabòlits o la seva producció, s'estudiarà l'efecte de la glucosa, amoni i fosfat (com a substrats principals), i l'acetat (com a subproducte).

La sèrie experimental es realitza en erlenmeyers de 250 ml amb un volum de treball de 50 ml, a 37°C i una velocitat d'agitació de 200 rpm. Els inòculs provenen de cultius crescuts en erlenmeyer, i la concentració cel·lular inicial és de 0,15 g (pes sec)/L. Les mostres s'extreuen en intervals d'una hora aproximadament, durant les primeres 5-6 hores de cultiu.

## Efecte de la concentració de glucosa.

En primer lloc s'estudia el principal substrat, la font de carboni i energia del medi de cultiu. Si es considera la glucosa, el rendiment que s'ha calculat és proper a 0,3 g de cèl·lules generades per gram de substrat consumit, i donat que es planteja l'objectiu de superar els 50 g/L de pes sec en els cultius d'alta densitat, resultarà necessària l'addició de més de 200 grams totals de glucosa (suposant un volum final de 1250 ml). Per tant, la velocitat a la que es pugui administrar la glucosa, i la càrrega del medi inicial es podran definir a partir de la concentració d'inhibició.

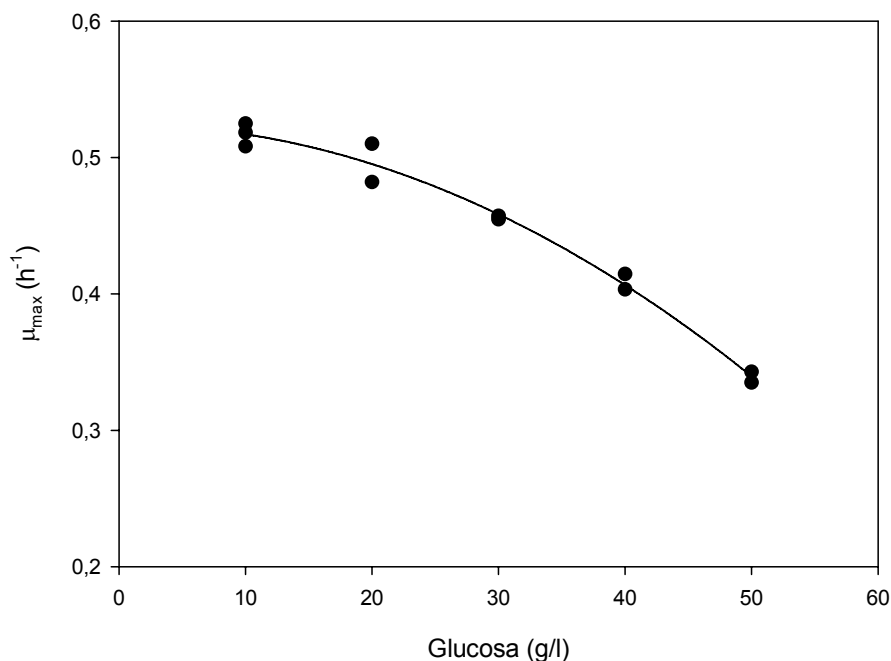


Figura 8-4 Variació de la velocitat específica màxima de creixement de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal en cultius en discontinu en funció de la concentració inicial de glucosa en medi MD.

Els resultats mostren que per a una concentració entre 10 i 20 g/L de glucosa en el medi inicial de cultiu, la velocitat de creixement no varia gaire i es manté al voltant de  $0,5 h^{-1}$  (Figura 8-4). A partir de 20 g/L la disminució de la velocitat específica de creixement és més notòria, assolint un valor 35-40% inferior quan la concentració del substrat és de 50 g/L. En conseqüència, es defineix que la concentració límit de glucosa en el medi de cultiu no ha de superar els 20 g/L.

## Efecte de la concentració d'amoni.

L'amoni és un substrat imprescindible com a font de nitrogen per a la conformació d'aminoàcids, tot i que en quantitats menors que la glucosa. L'amoni, a part de ser emprat com a font de nitrogen, resulta crític perquè també serà usat com a regulador del pH durant el bioprocés, evitant així l'addició d'altres substàncies reguladores de pH, com el NaOH o el KOH, que augmenten la càrrega osmòtica del medi de cultiu.

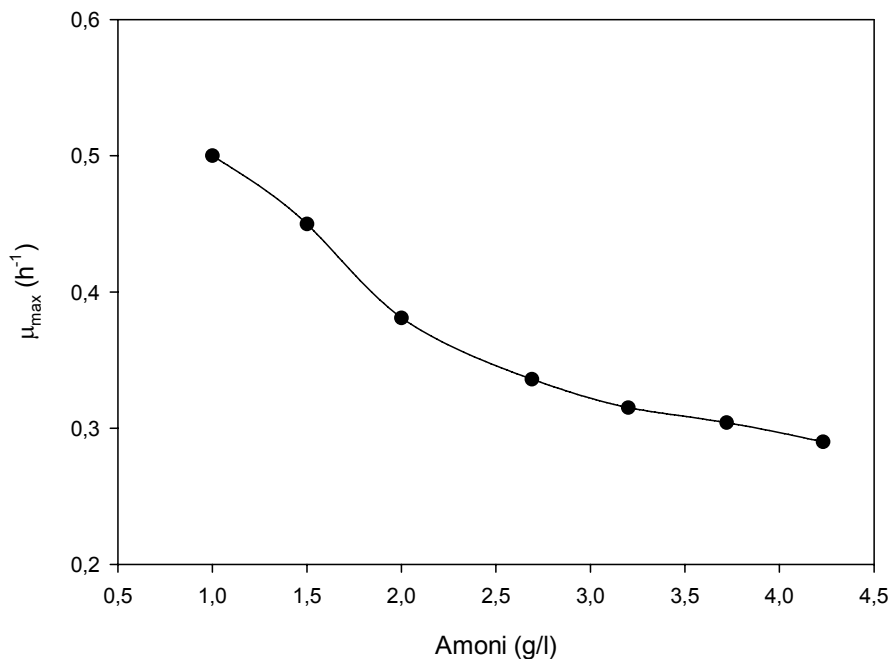


Figura 8-5 Variació de la velocitat específica màxima de creixement de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal en cultius en discontinu en funció de la concentració de amoni exogen inicial, addicionat al medi MD.

L'experiment es dissenya a partir de l'addició d'amoni al medi MD, i afegint-hi diferents quantitats d'amoni, entre 0 g/L fins 3,25 g/L d'amoni en els diferents erlenmeyers. A aquesta concentració s'hi ha de sumar la concentració d'amoni que el medi MD ja duu inicialment en la seva composició (1 g/L), per aquest motiu, a la Figura 8-5 es representa l'amoni total present en el medi, obtenint-se com a rang d'estudi valors des de 1 g/L fins a 4,25 g/L. El pH del medi s'ajusta amb HCl, per a evitar l'efecte del canvi pH en el creixement, i que la inhibició per amoni pogués quedar emmascarada.

Els resultats mostrats a la Figura 8-5 denoten l'important efecte inhibitori de l'amoni sobre la velocitat de creixement del cultiu. Per valors de concentració d'amoni de 2 g/L la velocitat específica de creixement disminueix a  $0,35 h^{-1}$ , un 30% menys que el valor de la velocitat calculada pel medi MD. El descens en el valor de la velocitat específica de creixement

respecte l'augment gradual de la concentració d'amoni per sobre de 2 g/L, és menor i es manté en un valor proper a  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , representant un descens del 40% del seu valor. Els resultats obtinguts delimiten un estret marge on la concentració d'amoni esdevé no inhibidora, i aquest marge es limita a concentracions d'amoni inferiors a 1,5 g/L.

### **Efecte de la concentració del fòsfor.**

El fòsfor és un element necessari per a la síntesi de RNA i DNA, i com a recurs d'emmagatzematge d'energia degut a la gran quantitat d'energia dels enllaços de fosforil·lació. No obstant, el seu consum i percentatge en la composició cel·lular és molt menor. La relació de presència del fòsfor respecte el carboni és 50 vegades inferior en unitats molars (Vila·2001).

Observant la Taula 8-3 on es mostra la composició elemental del bacteri *E.coli*, la relació que hi ha entre la presència de carboni i de fòsfor en la composició cel·lular és de 30 vegades superior pel carboni (en unitats màssiques). A més, s'ha de tenir en compte que part del carboni que l'organisme consumeix provinent de la font de carboni principal, és expulsat en forma de  $\text{CO}_2$  i altres subproductes per tal de poder aconseguir energia, i consegüentment, la concentració de carboni (en forma de font de carboni) en el medi ha de ser major de 30 vegades respecte la de fòsfor.

Element	Contingut de l'element en l'organisme	
	En % (g/g pes sec)	
C	90,91%	
N	10%	
P	2,94%	
K	1,89%	
Na	1%	
S	0,61%	

---

Taula 8-3: Presència de cada un dels elements principals que conformen la composició del bacteri *E.coli* expressats en funció percentual referida al pes sec (Bailey i Ollis·1977).

---

La peculiaritat del fòsfor, és la seva administració en els cultius en forma d'ió fosfat. Degut a molt baixa solubilitat, la seva addició o concentració en el medi de cultiu està limitada, i aquest és un fet que cal tenir en compte, per exemple, en el moment de preparar medis concentrats per a cultius en discontinu alimentat, on es poden formar precipitats. El medi MD

en la seva composició conté 2,75 g/L de fòsfor comptabilitzant els dos compostos presents  $K_2HPO_4$  i  $KH_2PO_4$ . L'estudi de l'efecte de fòsfor inclou des de la meitat de la composició inicial 1,378 g/L, fins a una càrrega de 6,1 g/L, i es desenvolupa en les mateixes condicions que els experiments dels anteriors apartats.

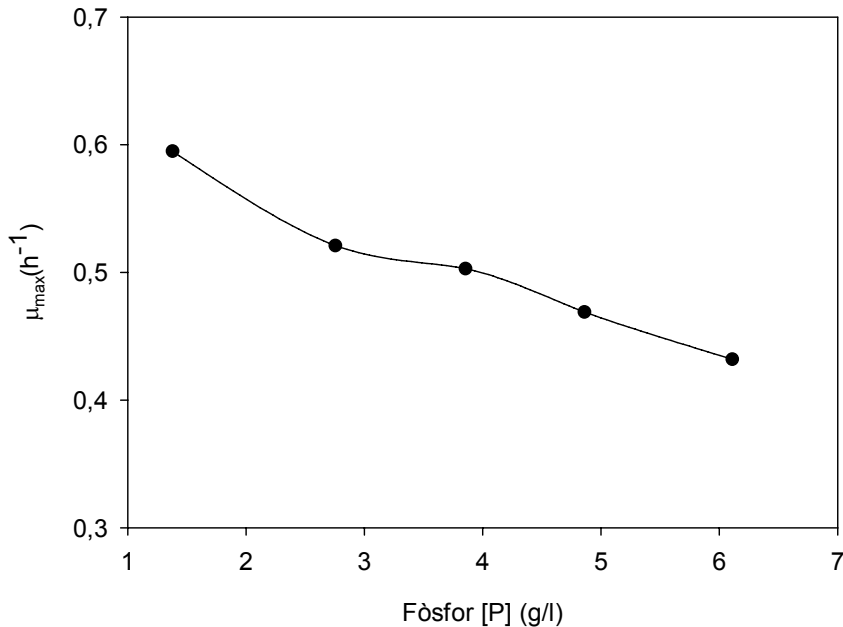


Figura 8-6: Variació de la velocitat específica màxima de creixement de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal en cultius en discontinu en funció de la concentració de fòsfor inicial en medi MD.

Els resultats presentats a la Figura 8-6 mostren una inhibició progressiva del creixement a mesura que augmenta la concentració de fosfat, inclús el medi MD mostra una velocitat menor que el medi MD en que s'ha rebaixat la concentració de fosfat a la meitat. En el medi MD s'observa una velocitat específica màxima de creixement de  $0,5 h^{-1}$  com ja s'havia observat repetidament en els experiments anteriors, mentre que el medi MD amb la meitat de la càrrega inicial de fosfat, la velocitat augmenta fins a  $0,6 h^{-1}$ . La resta del rang de concentracions estudiat mostra una progressiva disminució de la velocitat específica fins a valors propers a  $0,4 h^{-1}$ . Per tant, la conclusió que se'n extreu és que el medi amb la seva composició inicial ja té una certa inhibició, per tant es podria considerar l'opció de disminuir la càrrega de fosfat en el medi MD. No obstant, s'ha de considerar que l'administració de fosfat s'haurà de realitzar independentment de l'addició de medi concentrat, ja sigui de forma manual o automatitzada. Consultant dades d'altres estudis, s'observa que el rendiment biomassa-fòsfor és aproximadament de 34 grams de pes sec per cada gram de fòsfor consumit (Luis Vidal-2006), per tant es pren una solució de compromís que consisteix en conservar la composició de fosfat del medi MD, de manera que aportí suficient quantitat per a desenvolupar el cultiu. En aquells cultius que es cregui oportú degut a la seva alta densitat cel·lular és

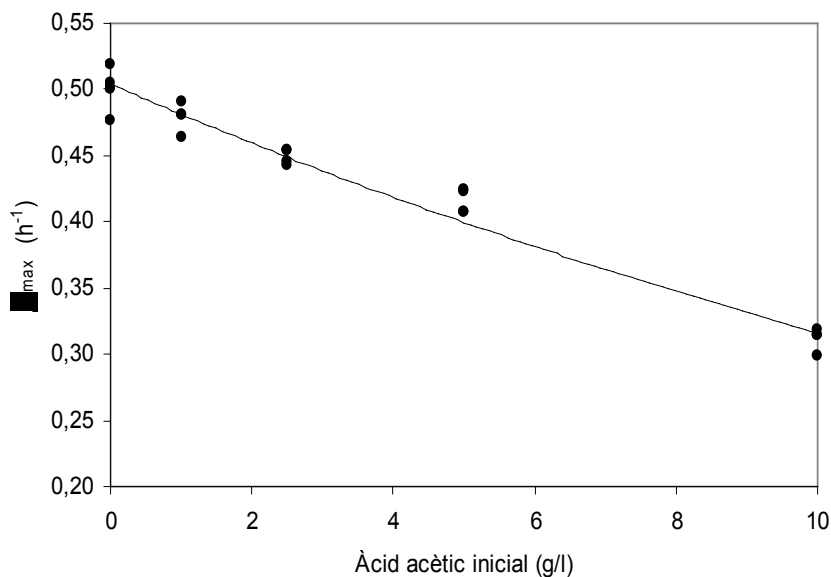
realitzarà una addició puntual de fosfats, evitant així la necessitat d'automatitzar l'addició de fosfats al llarg del cultiu.

### **Efecte de la concentració d'àcid acètic sobre el sistema d'expressió: velocitat específica de creixement i velocitat específica de producció de la proteïna d'interès.**

L'àcid acètic és el subproducte majoritari en els cultius d' *Escherichia coli*, i la seva acumulació en el brou de cultiu, no tan sols pot inhibir el creixement cel·lular, sinó que a més a més afecta també l'expressió de proteïnes recombinants, com ja s'ha discutit més àmpliament en el present capítol.

Així doncs, si no hi ha una limitació en el medi de cultiu que forci una reestructuració metabòlica de l'organisme, l'acumulació d'àcid acètic inhibirà el creixement bacterià provocant una disminució de la velocitat de creixement del cultiu. A mesura que augmenti la durada del cultiu per tal obtenir altes densitats cel·lulars, aquesta problemàtica s'agreuja.

L'experiment que es mostra a la Figura 8-7 es planteja de forma homòloga a la que s'han realitzat la resta, afegint al medi MD diferents concentracions d'àcid acètic (entre 0 i 10 g/L).



---

Figura 8-7: Variació de la velocitat específica màxima de creixement de la soca M15 pTCO46- $\beta$ gal en cultius en discontinu en funció de la concentració d'àcid acètic exogen inicial en el medi MD.

---

El rang de concentracions d'àcid acètic estudiat és de 0 a 10g/L en el medi MD inicial, observant-se un efecte clarament inhibitori. La velocitat específica màxima de creixement en absència de d'àcid acètic té un valor de  $0,5 \text{ h}^{-1}$  (valor observat habitualment en el medi MD), i comença a disminuir de forma pràcticament lineal a mesura que augmenta la concentració d'àcid acètic fins a valors inferiors a  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , és a dir, una reducció del 40% quan la concentració del metabòlit és de 10g/L.

D'acord amb altres autors que han estudiat diferents sistemes d'expressió de proteïnes recombinants en *E.coli*, l'àcid acètic és el subproducte que més afecta a la seva expressió (Brown i col.:1985; Rinas i col.:1989). Un estudi en continu en condicions limitants de glucosa, i addició d'àcid acètic fins a 2,4 g/L reduïa la velocitat específica de producció de la proteïna recombinant en un 38% (Bech-Jensen i Carlsen:1990).

Per estudiar aquest efecte, es realitzen cultius en que al medi inicial se li afegeix una quantitat d'àcid acètic exogen, i es procedeix a la inducció del cultiu amb l'addició d'IPTG 1mM, i s'avaluen les velocitats específiques de producció de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa. Els resultats es mostren a la Figura 8-8.

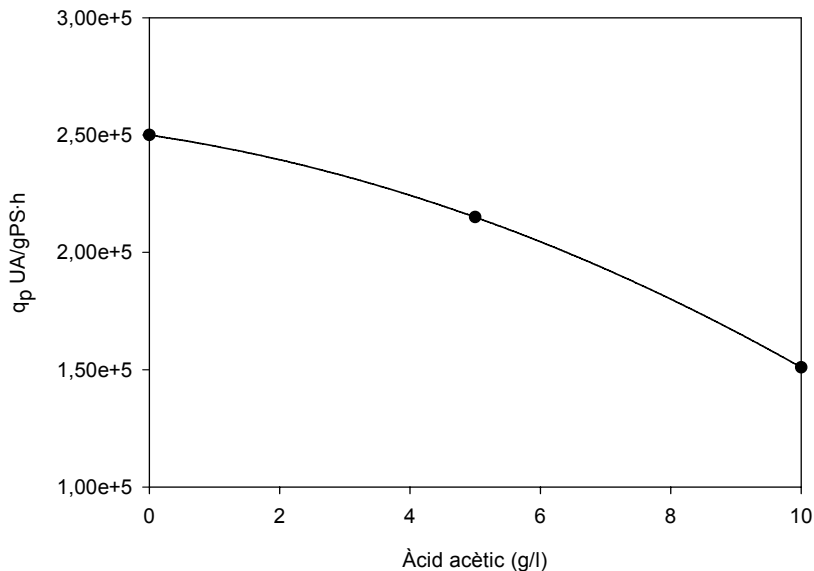


Figura 8-8: Efecte de la concentració d'àcid acètic en el brou del cultiu sobre la velocitat específica de producció de la  $\beta$ -galactosidasa. La concentració d'àcid acètic està referida a HAC exogen que s'ha introduït al medi de cultiu.

Els resultats que s'han obtingut indiquen que, efectivament, la concentració d'àcid acètic inhibeix la velocitat específica de producció de la proteïna d'interès, que es valora amb una pèrdua d'un 16% de l'expressió quan s'indueix el cultiu amb una presència de 5 g/L d'àcid acètic, i aquesta pèrdua augmenta fins a un 40% quan la concentració d'àcid acètic és de 10 g/L. S'ha de tenir en compte que, des d'un punt de vista de productivitat volumètrica, la disminució d'aquesta en presència d'àcid acètic, serà deguda a un efecte conjugat de la disminució de la velocitat de generació de cèl·lules, i de la disminució de la productivitat específica d'aquetes, i conseqüentment els efectes de la inhibició resultaran més severos.

Observant els resultats, es fixa que la concentració d'acetat recomanable en els cultius d'alta densitat cel·lular sigui inferior a 2 g/L, per a evitar així la disminució de la velocitat específica de creixement per efectes d'inhibició, i la disminució de la velocitat específica de producció de la proteïna recombinant.

### **8.3. Cultius d'alta densitat cel·lular en bioreactors.**

Els cultius d'alta densitat cel·lular d'*E.coli*, com en els cassos precedents, han de ser definits mitjançant estratègies que tinguin en compte el metabolisme cel·lular, el creixement, els requeriments de nutrients, i l'acumulació de metabòlits inhibidors, com l'àcid acètic. Pel que fa a aquest darrer punt, estudis en cultius en continu apunten a la limitació de la velocitat del metabolisme oxidatiu de la *E.coli*, com a responsable de l'acumulació d'àcid acètic (Han *i col.*·1992; Suarez i Kilikian·2000).

En cultius on la velocitat de creixement està limitada, o és baixa, l'abastiment dels requeriments d'anabòlits i de catabòlits pot ser cobert pel metabolisme oxidatiu, mentre que en cultius amb velocitats de creixement més altes, aquests requeriments no serien del tot coberts, i la derivació de la ruta de la glucòlisi i del CAT cap a la formació de àcid acètic permet facilitar la demanda d'energia (ATP), i poder reductor ( $\text{NADH}_2$ ) necessaris (Han *i col.*·1992). Segons les soques emprades i les condicions de cultiu dels diferents experiments, la velocitat crítica de dilució dels experiments en continu en el que no s'observa acumulació de àcid acètic varien entre  $0,17 \text{ h}^{-1}$  (Korz *i col.*·1995) i  $0,35 \text{ h}^{-1}$  (Riesenberg·1991).

La Figura 8-9 mostra de forma aproximada (basant-se en dades bibliogràfiques) la relació que hi ha entre la velocitat específica de producció d'àcid acètic i la velocitat específica de creixement. S'observa que hi ha dues zones diferenciades: la zona A, correspon a nivells de limitació de la velocitat específica de creixement (per limitació de l'addició de substrats) i en



aquest cas, no hi excreció d'àcid acètic al brou de cultiu. Per altra banda, la zona B correspon a aquelles velocitats de cultiu que tenen associades producció de subproductes d'oxidació incompleta, degut a l'estat metabòlic més activat.

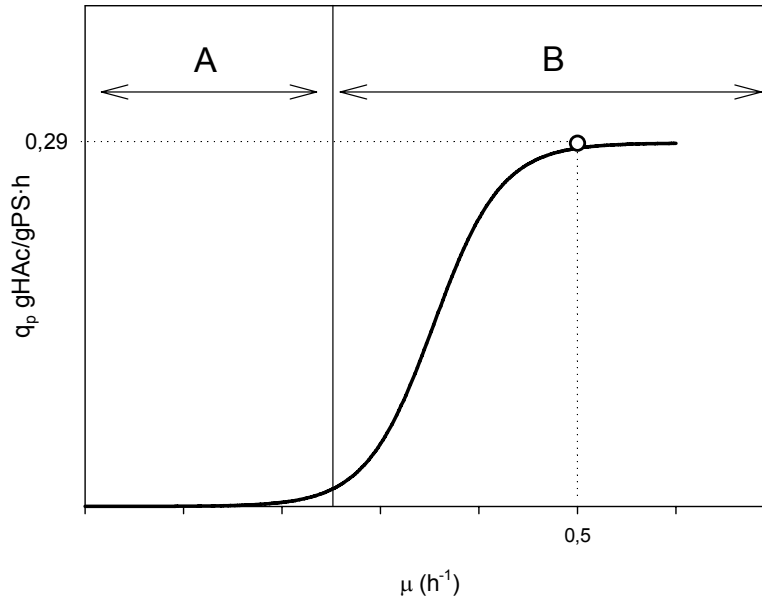


Figura 8-9: Esquema il·lustratiu de la variació de la velocitat específica de producció d'àcid acètic, en funció de la velocitat específica de creixement. El perfil de la corba és aproximat i orientatiu, basat en dades bibliogràfiques. El punt (o) correspon al valor que s'ha obtingut en la fase de creixement exponencial del cultiu en discontinu en aquest treball (Figura 8-2). La zona A correspondria a les velocitats específiques de creixement on no es produeix excreció d'àcid acètic al medi, mentre que la zona B correspondria al cas contrari.

L'estratègia a plantejar per a aconseguir cultius d'alta densitat, haurà de basar-se en la limitació de l'acumulació d'àcid acètic que pogués inhibir el creixement cel·lular. De les diferents estratègies que s'han descrit per a controlar la concentració de l'acetat es destaquen dos grups diferenciats: l'extracció de l'acetat produït del medi, i evitar l'excreció d'aquest subproducte.

El primer grup, i el menys extens, es centra en estratègies de perfusió o diàlisi, és a dir, estratègies en que el medi fresc entra en el sistema i s'extreu medi parcialment o totalment esgotat, retenint les cèl·lules en el bioreactor (Fuchs *i col.*·2002). Les condicions de cultiu en les que treballen és situen en la zona B del gràfic, per tant, no limiten la velocitat específica de creixement. Aquests sistemes necessiten de mòduls de filtració tangencial, o bé membranes de diàlisi, a part d'equips per a la circulació dels fluids, així com un volum molt major de medi. Aquestes característiques fan descartar aquesta estratègia de cultiu en aquest treball. No obstant, s'ha de remarcar els alts nivells de concentració cel·lular aconseguida amb aquesta metodologia, al voltant de 190 g de pes sec/L (Nakano *i col.*·1997).

El segon gran grup es centra en evitar l'acumulació d'acetat en el medi de cultiu, sense la necessitat d'extreure medi esgotat del bioreactor, situant-se en la zona A del gràfic. Aquest tipus d'estratègia es centra en cultius discontinus alimentats on es limita la velocitat específica de creixement. Aquests sistemes són molt més senzills i barats, i han permès assolir bons resultats com concentracions cel·lulars de 150 g de pes sec/L (Horn *i col.*·1996). D'aquest segon grup s'han descrit diferents estratègies per a controlar l'alimentació del medi concentrat, des de models de creixement exponencial fixats (llaços de control prefixats i sense retroalimentació de mesures en línia) (Wilms *i col.*·2001), o controls de la velocitat específica de creixement a partir de la mesura en línia de la font de carboni (Macaloney *i col.*·1996), o bé per manteniment de variables en un valor constant com poden ser el pH o l'oxigen dissolt (Akesson *i col.*· 2001).

Un dels aspectes més sensibles a l'hora de desenvolupar aquestes estratègies consisteix en fixar la velocitat específica de creixement del cultiu. Aquest valor s'ajustarà en aquest treball a mesura que es realitzin els diferents cultius d'alta densitat cel·lular, amb una aproximació experimental del tipus prova-error.

### **8.3.1. Estratègia per a cultius d'alta densitat cel·lular: Cultius discontinus alimentats d'*E.coli*.**

El criteri que s'ha fet prevaldre a l'hora de definir els sistemes CADC és el de desenvolupar sistemes que siguin robusts, relativament simples i amb pocs requeriments d'instrumentació i d'equipament auxiliar. El sistemes en discontinu alimentat poden complir amb aquestes condicions, i permeten obtenir nivells elevats de concentració cel·lular i altes productivitats. D'altra banda, donada la seva relativa simplicitat, el seu cost és inferior respecte a altres sistemes com la perfusió.

També s'han emprat criteris similars per a l'elecció del sistema de control de llaç obert (perfil d'addicions prefixat). S'escull el sistema més simple i econòmic que consisteix en l'addició del medi concentrat seguint un perfil d'addició prefixat a partir de valors dels paràmetres calculats amb anterioritat, sense emprar un llaç tancat de control. Així doncs, les mesures en línia no són utilitzades per a adequar el sistema d'addició a les possibles perturbacions que poguessin succeir. Aquesta és la principal desavantatge d'aquest sistema,

però es pot pal·liar el seu possible efecte emprant uns valors dels paràmetres de control conservatius. El tipus d'addició pot ésser constant, amb un augment lineal, o bé amb un augment exponencial. El perfil escollit ha estat l'exponencial, degut a que s'ajusta més al perfil requerit per a un cultiu, i també permet assolir altes densitats cel·lulars en menor temps que els altres tipus de perfils d'addició, mantenint controlada la velocitat específica de creixement.

L'algoritme d'addició del medi concentrat es defineix a partir dels balanços de matèria, de substrat, i de biomassa aplicats en un sistema discontinu alimentat, que es detalla en les següents equacions:

$$Q_e \cdot S_0 - r_s \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 8-1}$$

$$Q_e \cdot S_0 = r_s \cdot V \quad \text{Equació 8-2}$$

$$r_s = \left( \frac{1}{Y'_{XS}} \cdot \mu + m_{SX} \right) \cdot X \quad \text{Equació 8-3}$$

$$r_s = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu \cdot X \quad \text{Equació 8-4}$$

$$Q_e \cdot S_0 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu \cdot X \cdot V \quad \text{Equació 8-5}$$

On  $Q_e$  és el cabal d'entrada,  $S$ , la concentració de substrat,  $S_0$ , concentració de substrat al medi d'addició,  $r_s$ , velocitat de consum del substrat,  $X$ , concentració cel·lular,  $Y'_{XS}$ , redniment biomassa-substrat intrínsec,  $Y_{XS}$ , redniment biomassa-substrat aparent.

Partint de l'expressió general del balanç de matèria aplicat al substrat en un sistema discontinu alimentat on la sortida és nul·la (Equació 8-1), i donada l'estratègia de limitació de substrat per a limitar la velocitat específica de creixement (per tant la concentració de substrat al bioreactor serà zero), s'obté Equació 8-2. Considerant l'expressió de la velocitat de consum de substrat, aquest es destina a la producció de les cèl·lules i al seu manteniment (Equació 8-3), però que pot ser simplificada substituint el rendiment intrínsec biomassa-substrat ( $Y'_{XS}$ ) pel rendiment biomassa-substrat observat o aparent ( $Y_{XS}$ ), el qual ja té en compte el terme

manteniment ( $m_{sX}$ ) (Equació 8-4), i substituint en l'expressió del balanç (Equació 8-2) s'obté finalment l'expressió descrita a l'Equació 8-5.

A continuació s'ha d'avaluar el balanç de matèria aplicat a la concentració de cèl·lules per a posteriorment relacionar els dos balanços: partint igualment del balanç general i degut a que en el medi d'addició no hi ha cèl·lules, i que la sortida continua sent nul·la s'obté l'Equació 8-6. La definició de velocitat de producció de cèl·lules ve donada per l'expressió de l'Equació 8-7, que substituint en el balanç proporciona l'Equació 8-8.

$$0 - r_X \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 8-6}$$

$$r_X = \mu \cdot X \quad \text{Equació 8-7}$$

$$\mu \cdot X \cdot V = \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 8-8}$$

$$\mu \cdot dt = \frac{d(X \cdot V)}{X \cdot V} \quad \text{Equació 8-9}$$

$$\ln\left(\frac{X_{i+1} \cdot V_{i+1}}{X_i \cdot V_i}\right) = \mu \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad \text{Equació 8-10}$$

$$X_{i+1} \cdot V_{i+1} = X_i \cdot V_i \cdot \exp(\mu \cdot \Delta t) \quad \text{Equació 8-11}$$

On els subíndex  $i$  és el valor de la variable en el moment determinat, i el subíndex  $i+1$  és la projecció del valor de la variable que s'espera al final de l'interval corresponent a l'addició de medi en el moment  $i$ .

Reordenant les variables amb els seus respectius diferencials per a poder integrar l'Equació 8-9, i considerant com una única variable el terme " $V \cdot X$ ", és a dir la quantitat de cèl·lules totals, es pot integrar l'equació obtenint-se l'Equació 8-10, i transformar-la en equació exponencial arribant a l'Equació 8-11.

Finalment, resta relacionar els balanços de matèria aplicats a les cèl·lules i al substrat per a poder calcular la quantitat de substrat necessari per a fer créixer el cultiu a una velocitat

determinada durant un període de temps futur. Així doncs, s'igualava l'Equació 8-5 amb l'Equació 8-8, obtenint-se l'Equació 8-12.

$$Q_e \cdot S_0 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 8-12}$$

$$S_0 \int_{t_i}^{t_{i+1}} Q_e \cdot dt = \frac{1}{Y_{XS}} \int_{X_i V_i}^{X_{i+1} V_{i+1}} \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{Equació 8-13}$$

$$S_0 \cdot V_A(t_i) = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot (X_{i+1} \cdot V_{i+1} - X_i \cdot V_i) \quad \text{Equació 8-14}$$

$$V_A(t_i) = \frac{1}{S_0 \cdot Y_{XS}} \cdot [X_i \cdot V_i \cdot \exp(\mu \cdot \Delta t) - X_i \cdot V_i] \quad \text{Equació 8-15}$$

$$V_A(t_i) = \frac{1}{S_0 \cdot Y_{XS}} \cdot X_i \cdot V_i \cdot [\exp(\mu \cdot \Delta t) - 1] \quad \text{Equació 8-16}$$

Integrant l'Equació 8-12, tenint en compte que la concentració de substrat del medi d'addició ( $S_0$ ) i el rendiment biomassa-substrat ( $Y_{XS}$ ) són constants, i que el cabal del medi d'addició per a cada interval de temps serà puntual i també constant, i per tant  $V_A = Q_e \cdot \Delta t$ , s'obté l'Equació 8-14. Si en aquesta expressió es substitueix l'Equació 8-11 que relaciona la concentració cel·lular en un instant de temps determinat  $t_i$ , i la concentració cel·lular en un instant de temps projectat al futur  $t_{i+1}$ , s'obté l'Equació 8-15, que si es reorganitza i es treu factor comú dels termes  $X_i \cdot V_i$  s'obté, finalment, l'equació que relaciona el volum de medi d'addició que s'ha d'afegir en l'instant de temps  $t_i$ , considerant la quantitat de cèl·lules totals que es generarà fins a la següent addició (Equació 8-16).

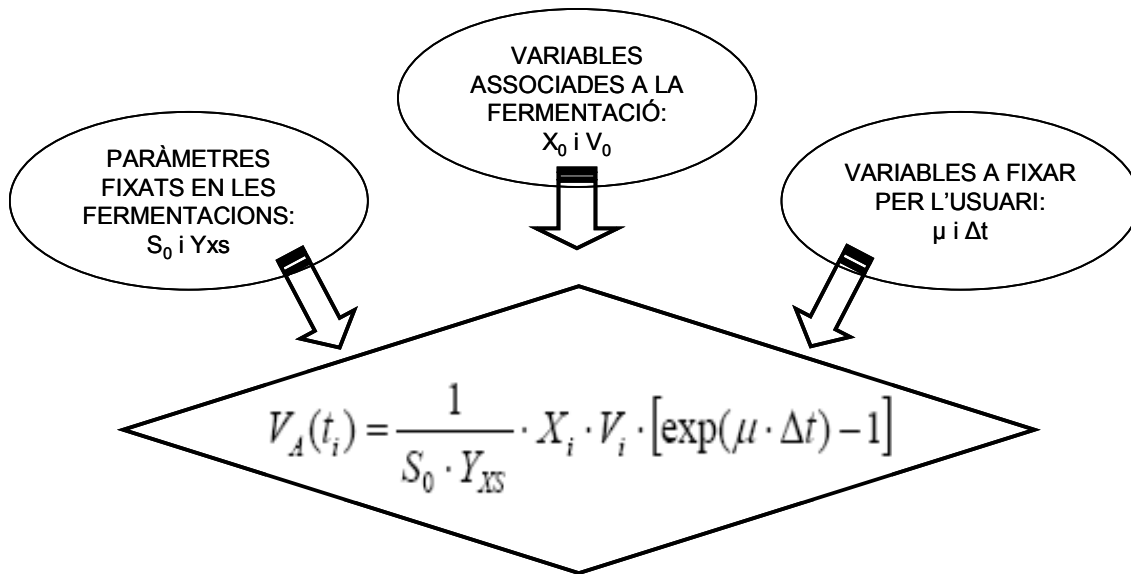


Figura 8-10: Funció bàsica emprada per a definir les addicions a efectuar al llarg dels cultius que empen l'estratègia discontinua alimentada d'*E. coli* M15. En l'esquema es mostren diferents tipus de variables en funció de les seves característiques.

Tenint en compte tots aquests aspectes, es desenvolupa un programari per tal de poder automatitzar cultius en discontinu alimentat seguint aquesta estratègia. S'ha utilitzat l'entorn labwindows.cvi. A la Figura 8-10 es mostra els diferents grups de variables i paràmetres que són usats en el programa de control segons la seva naturalesa i possible ús.

En primer lloc, hi ha el grup de paràmetres intrínsecs a la soca i al medi de cultiu utilitzat, i mentre s'usi la mateixa soca i medi, aquests seran constants en totes les fermentacions. Són paràmetres que estan definits directament al programa, i que es calculen a partir de la mitjana dels valors obtinguts en els experiments previs. Pel càlcul del perfil d'addició s'utilitza un valor de concentració de substrat del medi MD d'addició concentrat de  $S_0=592$  g/L (concentració resultant d'afegir la resta de solucions estoc a una solució concentrada de 600 g/L de glucosa), i un valor de rendiment aparent biomassa-substrat de  $Y_{XS}=0,48$  g de cèl·lules produïdes per gram de substrat consumit.

En el segon grup hi ha les variables que depenen de les variacions que hi pot haver en cadascun dels processos, com ara el volum inicial del cultiu, o la concentració de cèl·lules a l'inici de la fase d'addició. Aquests paràmetres estan recollits en el programari, i s'han d'actualitzar prèviament cada vegada que s'iniciï un cultiu. Tot i que aquest dos paràmetres estan definits independentment, una vegada han estat introduïts els seus valors al programari, són tractats com a una única variable, és a dir com la quantitat de cèl·lules totals que hi ha al

sistema, esdevenint el producte dels dos paràmetres ( $X_{TOT} = V_{INI} \cdot X_0$ ), permetent calcular els requeriments nutricionals del sistema a partir de la quantitat de cèl·lules totals.

Per últim, hi ha el grup dels paràmetres que permeten a l'usuari manipular i adequar el programari segons el seu criteri i l'objectiu desitjat. Entre aquests destaca la velocitat específica de creixement a la que es vol limitar el cultiu, i que pot ser variada en qualsevol moment des de la interfase del programari. Els valors usats en aquest treball oscil·len entre  $0,05 < \mu < 0,3 \text{ h}^{-1}$ , ja que han estat descrites com les velocitats crítiques, per sota o sobre de les quals, o s'acumula l'acetat o dificulta el creixement de la soca a causa de la sobrelimitació, provocant problemes d'assimilació de la glucosa (Luis Vidal-2006). Un altre paràmetre modificable és la freqüència de les addicions, és a dir, l'interval de temps entre addicions a partir del qual es calcula la quantitat de substrat a addicionar. Aquest valor és més elevat en un inici, ja que la poca quantitat de cèl·lules presents en els estadis inicials, i l'alta concentració de substrat del medi pot comportar valors de consigna de la bomba de desplaçament positiu excessivament baixos. A mesura que augmenta la densitat cel·lular aquest valor disminueix per aproximar-se més a una addició continuada, sense provocar canvis notables en les condicions de cultiu. Els seu valor oscil·la entre 180 segons a l'inici fins a 40-60 segons al final del cultiu.

### **8.3.2. Adequació i ajust dels paràmetres de control de l'estratègia d'addició dels cultius discontinus alimentats.**

#### **Cultius en discontinu alimentat sense inducció de l'expressió de la proteïna.**

En una primera fase es realitza l'estudi dels cultius d'alta densitat en discontinu alimentat emprant l'estratègia descrita, parant atenció a l'evolució de la concentració cel·lular, i sense realitzar encara la inducció de l'expressió de la proteïna heteròloga, que es realitza en una etapa posterior. Els experiments es duen a terme en un bioreactor de dos litres de volum, al que s'ha acoblat sistema de control de l'addició de medi concentrat en funció dels paràmetres fixats en cada experiment.

Inicialment es treballa amb la soca pTCO46- $\beta$ gal, i l'objectiu recau a comprovar i ajustar el programa de control, així com les condicions de cultiu per a les estratègies de CADC. Els cultius es realitzen a 37°C, a un pH de 7,00 i controlat únicament per l'addició de base ((NH<sub>4</sub>)OH) al 25% (v/v). L'aeració oscil·la entre 0,4 i 1,6 l/min (0,33 i 1,33 vvm), i l'agitació es realitza mitjançant discs de pales planes entre uns valors de 300 i 1000 rpm. L'aeració està controlada per la DCU (Unitat Digital de Control) del bioreactor per un doble control, on l'ordre d'actuació recau primerament sobre l'augment de l'agitació i posteriorment s'actua sobre el cabal d'aeració, definint-se com a valors de consigna respectius 50 i 40 % de pO<sub>2</sub>.

Els inòculs es preparen a partir de cultius en erlenmeyers de 1 litre amb un volum de treball de 200 ml, i la concentració d'inòcul inicial en el bioreactor es defineix entre 0,2 i 0,3 g(pes sec)/L per assegurar una fase de latència curta o inexistent.

A la Figura 8-11 es mostra el resultat del cultiu on implementa l'estratègia de cultiu discontinu alimentat. El gràfic es mostra dividit en dues parts diferenciades, la fase inicial discontinua que s'inicia amb la inoculació del bioreactor fins a l'esgotament de la font de carboni del medi inicial, i una segona fase, la corresponent al mode d'operació discontinu alimentat. En la fase discontinua es pot observar que l'inòcul disposa de 0,26 gPS/L, i observant la gràfica de l'evolució de la densitat òptica a 550nm, representada en un gràfic semi-logarítmic per a poder disposar de l'evolució de la velocitat específica de creixement cel·lular, no s'observa l'existència de cap fase de latència, creixent el cultiu exponencialment des d'un inici. La velocitat específica de creixement en aquesta fase és de 0,57 h<sup>-1</sup>.

El perfil de glucosa mostra la evolució esperada, disminuint progressivament i s'observa com augmenta la velocitat d'utilització a mesura que augmenta la concentració cel·lular. El perfil d'acumulació d'acètic com a resultat del metabolisme de l'*E.coli* augmenta proporcionalment al ritme que es consumeix la glucosa.



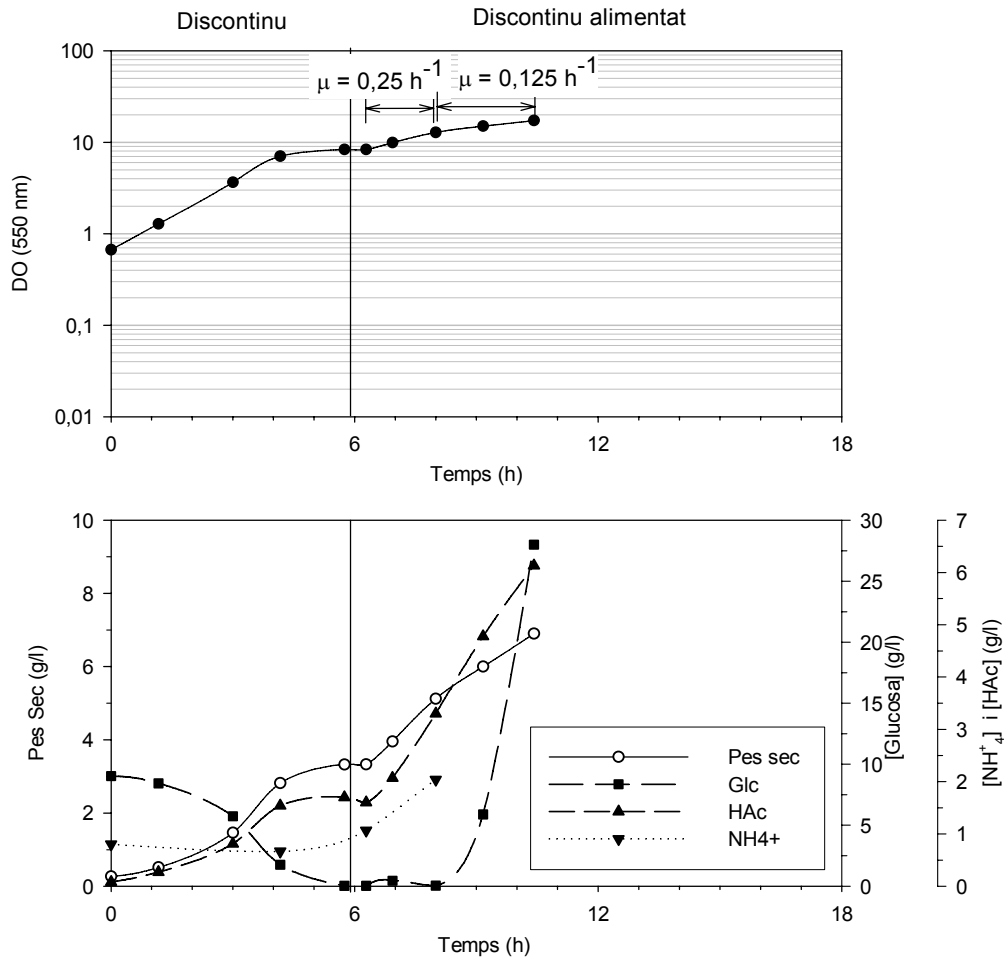


Figura 8-11: Discontinuu alimentat sense inducció de la soca pTCO46-bgal. Només es desenvolupa etapa de creixement. Descriu els límits de la velocitat específica de creixement i les concentracions de subproductes que provoquen inhibició en el creixement de la soca.

Al final de la etapa d'operació en discontinuu, s'observa com els diferents perfils de concentració cel·lular i d'acetat dibuixen un estancament del seu valor, indicant l'esgotament del substrat principal del medi de cultiu. L'esgotament de la font de carboni també es reflexa en la representació de la velocitat específica de creixement (gràfic superior), estabilitzant-se el valor d'absorbància, així com en l'aturada del consum d'oxigen i l'acidificació del medi (fet que es pot seguir directament mitjançant la menor necessitat d'actuació del sistema d'aeració i de pH per part de la DCU). De fet, s'observa que el pH, que al no disposar d'àcid per al seu control, augmenta suaument indicant una basificació del brou de cultiu. Aquest fet és degut a la capacitat d'*Escherichia coli* de reorganitzar les seves rutes metabòliques per a poder assimilar els subproductes d'oxidació incompleta, és a dir l'àcid acètic, en absència de cap altra font de carboni. L'observació d'aquest succés és el que marca l'inici del protocol d'addició de medi concentrat, que inicialment serà realitzat per l'usuari.

S'inicia el discontinu alimentat fixant una velocitat de creixement a un valor de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ , i durant l'inici de l'addició s'observa que tota la glucosa que s'addiciona és consumida, restant un valor residual al bioreactor. No obstant, una vegada iniciada l'estratègia d'addició s'observa que es comença a acumular l'acetat en el brou de cultiu, i a causa d'aquesta acumulació, també s'acumula amoni per tal de corregir el pH. Tot i acumular-se acetat i amoni, la glucosa que és afegida continua sent totalment consumida, fins que s'arriba a uns nivells d'amoni propers a  $2 \text{ g/L}$ , moment en que l'efecte inhibitori que produeix provoca que no es pugui consumir totalment la glucosa, que es va acumulant progressivament, conjuntament amb l'àcid acètic.

Aquesta tendència s'intenta corregir disminuint el valor de la velocitat específica de creixement, amb la hipòtesi que si augmenta la limitació en l'addició, l'organisme es veurà forçat a modificar el seu metabolisme i consumir l'acetat. Els resultats no mostren cap reacció del cultiu a aquest canvi, segurament sota uns efectes inhibitoris massa importants deguts bàsicament a la alta concentració d'amoni, no podent-se recuperar el cultiu.

Tot i haver-se iniciat l'addició en base a una velocitat de creixement limitada dins del rang descrit a la bibliografia, s'apunta l'opció que els canvis massa sobtats en aquest paràmetre poden aportar un desajust metabòlic, no deixant prou temps d'adaptació de l'organisme a les noves condicions, provocant una acumulació d'acetat i amoni en el brou. Així doncs, es planteja limitar més severament la velocitat específica de creixement en la fase de canvi d'operació de discontinu a discontinu alimentat, i s'estudiarà la possibilitat d'augmentar-la progressivament.

A la Figura 8-12 es mostren els resultats d'un cultiu en el que es limita de manera més severa la velocitat de creixement per a evitar els problemes derivats en l'anterior experiment. En aquest nou cultiu es mantenen la resta de condicions de cultiu idèntiques a l'anterior. La fase inicial del cultiu en la fase discontinua presenta un perfil semblant al cas anterior. A partir d'un inòcul de  $0,15 \text{ gPS/L}$  no s'observa la presència d'una fase de latència, i el cultiu creix a una velocitat de creixement específica aproximada de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ .

Quan s'assoleix el final de l'etapa en discontinu, marcada pel canvi de tendència del perfil de pH i l'augment del valor de  $pO_2$ , s'inicia la fase discontinua alimentada, fixant-se una velocitat de creixement de  $0,08 \text{ h}^{-1}$ .

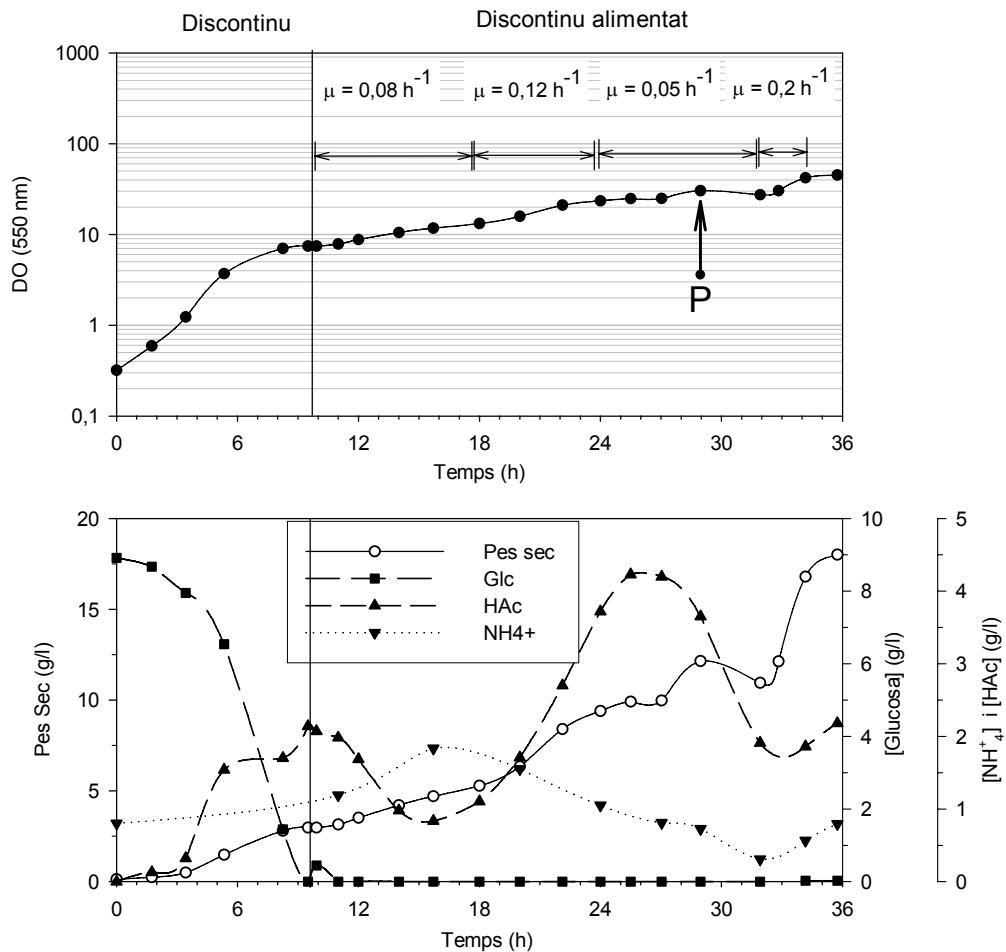


Figura 8-12: Experiment de cultiu en discontinuu alimentat de la soca pTCO46-bgal (induíble per IPTG). Evolució de la velocitat específica de creixement en les diferents fases del cultiu (a dalt), i de la concentració de cèl·lules, glucosa, acetat i amoni (a baix) amb el temps. La sageta ubicada sobre una lletra P indica una addició manual de la solució estoc de fosfats.

La Figura 8-12 mostra com a l'inici de la fase d'operació en discontinuu alimentat, on es limita la velocitat específica de creixement a  $0,08 \text{ h}^{-1}$ , es consumeix acetat que s'havia acumulat durant la fase discontinua, ja que la seva concentració disminueix de  $2 \text{ g/L}$  al final de la fase discontinua, fins a  $1 \text{ g/L}$ . Paral·lelament s'observa, com era d'esperar, que la concentració de glucosa es manté a zero al llarg de tota la fase alimentada. A les 16 hores de cultiu, accidentalment hi ha una forta addició d'hidròxid amoni, ja que degut a l'alta temperatura del laboratori de treball els vapors d'amoniac colmaten el filtre de l'ampolla d'addició, provocant una sobrepressió al sistema, que en el moment que addiciona un volum de base per corregir el pH, provoca una addició desmesurada i incontrolada de base. Els efectes de l'augment del valor de pH és compensat per una addició manual de HCl. Resulta interessant observar el canvi de metabolisme que es produeix al augmentar la concentració de

amoni a gairebé un valor de 2 g/L, per sobre de la definida amb anterioritat com a inhibidora. A partir de l'accident, el consum de l'acetat per part de l'organisme queda del tot anul·lat, i es reestructura de nou el metabolisme començant a excretar el subproducte al brou de cultiu, que s'acumula fins a uns valors propers a 4 g/L.

Degut a l'alta concentració d'amoni, a les 16 hores es canvia la solució bàsica d'amoni per una de NaOH al 30% (p/v), per a evitar més acumulació d'amoni, el perfil del qual disminueix a partir del canvi de base, degut en part pel consum dels organismes, i en part per la pròpia evaporació forçada per l'aeració.

La tendència acumulativa de l'acetat no es corregeix fins que es disminueix el valor de la velocitat específica de creixement pel càlcul de l'addició de medi concentrat fins al rang mínim descrit a la bibliografia, a  $0,05 \text{ h}^{-1}$ . Al provocar-se aquesta forta limitació de creixement i per tant de nutrients, s'aconsegueix frenar l'acumulació de l'acetat i aquest torna a ser consumit, degut a la forta limitació de font de carboni i energia a la que es sotmet el cultiu.

Finalment, cap a les 32 hores de cultiu es restitueix l'addició d'amoni com a agent per a controlar el pH, ja que el valor de la seva concentració havia disminuït fins a valors propers a 0,5 g/L. Coincidint en aquest moment, i observant-se la forta davallada de la concentració d'acetat, es decideix augmentar el valor de la velocitat específica de creixement fins a  $0,2 \text{ h}^{-1}$  per a confirmar el fenomen d'adaptació metabòlica al realitzar canvis sobtats de l'alimentació, tal i com s'havia observat en el cultiu presentat a la Figura 8-11. Efectivament, es repeteix el fenomen, observant-se de nou una acumulació d'acetat i la conseqüent acumulació d'amoni. Una important observació d'aquesta sèrie experimental és que si es vol evitar canvis massa pronunciats en el comportament metabòlic del bacteri, els canvis del valor de la consigna de la velocitat específica de creixement han de ser introduïts de forma suau.

Cal assenyalar que a partir de valors de concentració cel·lular superiors a 8 gPS/L, ha estat necessari enriquir el corrent d'aeració amb oxigen pur per tal de mantenir el nivell d'oxigen al reactor al voltant del 40%. Aquest enriquiment es produeix de manera que resulti el màxim efectiu, intentant evitar l'ús desmesurat de  $\text{O}_2$  pur. L'enriquiment es dissenya afegint al corrent d'entrada (emprant l'estació de mescla de gasos de la unitat de control del bioreactor), quan aquest ja es situa prop del seu màxim cabal ( $1,3 \text{ vvm}$ ) i es comença l'enriquiment amb un cabal d'oxigen de  $0,015 \text{ vvm}$  ( $1 \text{ l/h}$  aproximadament). Aquest cabal s'augmenta a mesura que la demanda d'oxigen augmenta en el bioreactor, podent-se deduir pel funcionament continu del motor d'agitació a altes revolucions.

Finalment, cal comentar que durant el cultiu s'ha realitzat una addició puntual (de forma manual) d'una solució estoc de fosfats, com s'indica a la Figura 8-12. Aquestes addicions es realitzen per assegurar que la concentració de fosfats en el brou de cultiu no sigui limitant, tot i que no hauria de ser-ho (la càrrega inicial de fosfats hauria de suportar gairebé cultius de fins a una concentració cel·lular de 32-36 gPS/L). D'aquesta manera s'assegura, d'una forma simple, que no es produeix aquesta limitació, i per tant s'evita que aparegui una nova variable que pogués limitar el cultiu.

Per altra banda, per encarar els futurs experiments, s'implementen canvis al sistema d'addició de  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  per a evitar possibles nous accidents, prenent dues mesures concretes:

- Es redueix la concentració de  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  del 25% al 20% per a disminuir l'evaporació de l'amoníac. No es disminueix més perquè el volum que requeriria per un cultiu d'aquestes característiques (CADC) per a controlar el pH, seria massa elevat.
- Per altra banda, i degut a que la composició del medi MD inicial de la fase discontinua ja porta una concentració d'amoní elevada (1 g/L), ja que es propera a la descrita com inhibidora (1,5 g/L), s'opta per a emprar un sistema en que s'usen dues bases pel control de pH, el NaOH per la fase discontinua del cultiu, i  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  per la fase discontinua alimentada, quan els requeriments de nitrogen siguin més elevats.

A la Figura 8-13 es mostra el resultat d'un cultiu una vegada han estat implementats els canvis en el sistema de control de pH. La resta de condicions de cultiu són idèntiques a l'anterior.

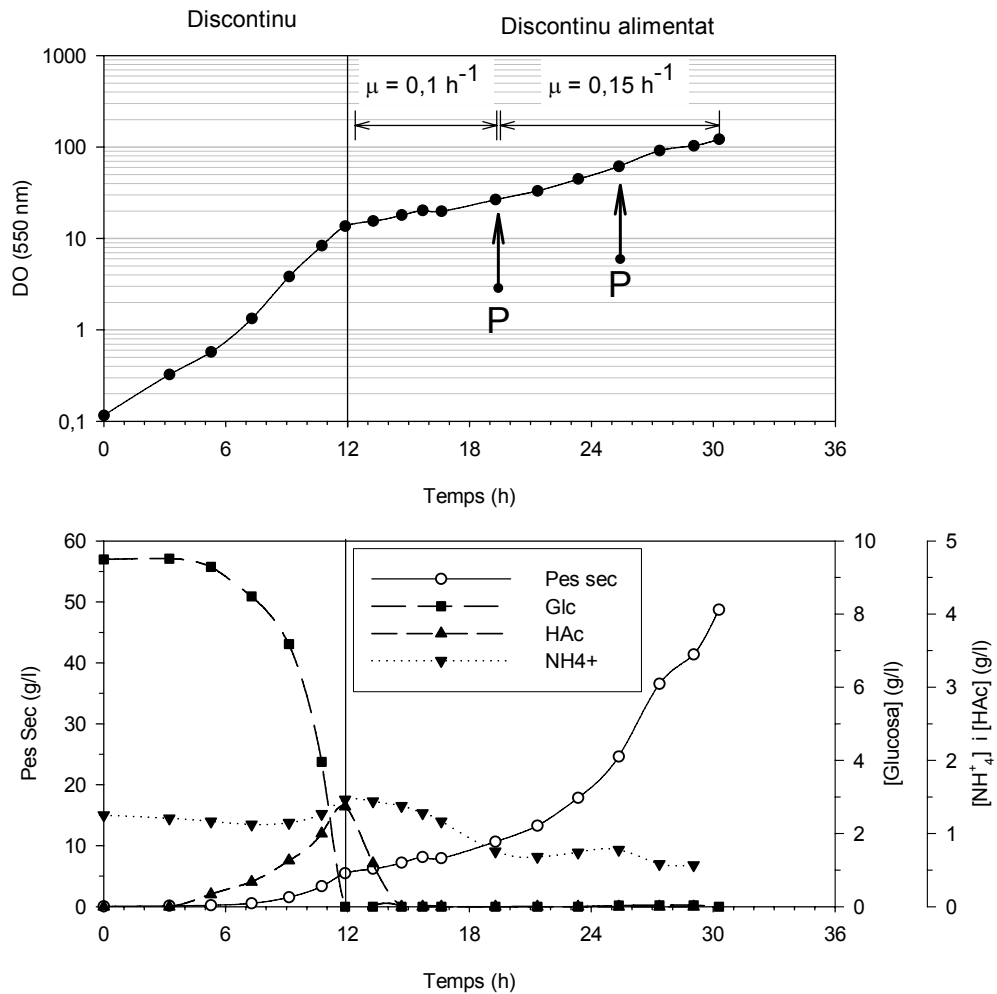


Figura 8-13: Experiment de cultiu en discontinuu alimentat de la soca pTCO46-bgal (induïble per IPTG). Evolució de la velocitat específica de creixement en les diferents fases del cultiu (a dalt), i de la concentració de cèl·lules, glucosa, acetat i amoni (a baix) amb el temps. La sageta ubicada sobre una lletra P indica una addició manual de la solució estoc de fosfats.

L'inòcul inicial és de 0,06 gPS/L, i degut al baix valor d'inòcul es pot apreciar que la fase de cultiu en discontinuu, és més prolongada que la observada en els cultius anteriors, passant de ser de 8-9 hores a 12 hores. Aquest fet és degut a l'existència d'una curta fase de latència, que es pot observar en la representació de la velocitat específica de creixement. No obstant, el cultiu arriba a assolir un desenvolupament correcte obtenint-se una velocitat de creixement específica al final de la fase discontinua de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , i un nivell de concentració cel·lular molt semblant al dels anteriors experiments.

Un cop finalitzada la fase de creixement discontinua, i després d'una fase de 7 hores a una velocitat de creixement específica de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , seguint el criteri d'efectuar canvis de

consigna poc sobtats, s'augmenta el valor de la velocitat específica de creixement del cultiu fins a un valor de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  observant-se la resposta del cultiu desitjada. És a dir, s'augmenta la velocitat de creixement, podent escurçar el temps necessari per a realitzar una producció, sense que es descontrolï el sistema i sense que no aparegui una acumulació de subproductes o metabòlits inhibitoris del creixement, augmentant així la productivitat volumètrica.

La fase discontinua alimentada s'inicia limitant la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , i s'observa la total desaparició de l'acetat acumulat durant la fase inicial a les tres hores d'alimentació controlada. El canvi de base pel control de pH es realitza paral·lelament a l'inici de l'alimentació de substrats. Pel que fa al perfil d'amoni en el brou de cultiu es pot observar com disminueix lentament al llarg del cultiu. Alguns autors apunten que en condicions limitants de substrats, en el que no hi ha acumulació d'acetat, tota la variació del pH és produïda pel consum o evaporació de l'amoni del brou de cultiu (Durany *i col.* 2005). En aquest concepte està basada l'estratègia d'addició d'amoni com a font de nitrogen per a mantenir constant la seva concentració al llarg del cultiu. No obstant, no es considera un paràmetre crític ja que la seva concentració disminueix de  $1,4 \text{ g/L}$  a  $0,57 \text{ g/L}$  al llarg de tot el cultiu, per tant s'ha de suposar que no arribarà a condicions limitants durant el procés. Tot i això, si es decideix prolongar el temps del bioprocés s'haurà de tenir en compte aquest fet, i realitzar alguna addició per a suplementar el descens de la seva concentració.

Com s'ha comentat anteriorment, durant el cultiu s'ha realitzat dues addicions puntuals de la solució estoc de fosfats, evitant així una limitació en la concentració del brou de cultiu que pogués causar cap distorsió en el creixement de l'organisme.

El resum d'aquesta sèrie experimental permet afirmar que s'ha definit una estratègia simple de cultius d' *E.coli* en discontinu alimentat que permet assolir concentracions cel·lulars importants de l'ordre de  $50 \text{ g/L}$  necessitant-se 30 hores de cultiu, que fa que resulti prou atractiu per estudiar l'expressió de la proteïna heteròloga en aquest sistema, com es descriu en el proper apartat.

### **Cultius en discontinu alimentat de la soca M15-pTCO46-βgal amb inducció d'expressió.**

La soca pTCO46-βgal duu el promotor tipus *lac* que permet realitzar la inducció de l'expressió proteica mitjançant la utilització de lactosa. La lactosa és una font de carboni que

és assimilable pel bacteri, de manera que el disseny d'un sistema que permeti mantenir un determinat nivell de lactosa al medi per a mantenir la pressió sobre l'expressió de la proteïna, i al mateix temps controlar la els efectes sobre el desenvolupament del cultiu, no és trivial, i de fet és contrari a l'aproximació que es vol fer en aquest treball, on es vol desenvolupar un sistema el més senzill possible. Per tal d'evitar l'ús d'un inductor assimilable, el més habitual és emprar com a inductor l'IPTG, que és una molècula sintètica d'estructura similar a la lactosa i que indueix l'expressió, però amb l'avantatge de no ser assimilable per l'organisme, permetent mantenir l'estratègia de creixement en discontinu alimentat amb limitació de glucosa i realitzar la inducció amb una concentració constant d'IPTG. No obstant, l'IPTG és un inductor car.

### **Determinació de la concentració d'IPTG necessària per a la inducció.**

És bastant habitual emprar concentracions d'IPTG de 1mM, tot i que es reconeix que aquesta concentració pot estar sobredimensionada. En els casos que es realitzen estudis de producció, és important ajustar la concentració d'IPTG, ja que un excés d'IPTG pot desembocar en una inhibició de la velocitat de creixement de l'organisme degut a la sobrecàrrega metabòlica que aquest pot provocar al iniciar l'expressió de la proteïna d'interès (Bentley *i col.*·1991). Una altra raó per a estudiar la quantitat d'IPTG òptima és el cost del producte, que com s'ha comentat resulta ser l'element més car de tots els emprats en les fermentacions de *E.coli*, per tant aquest és un element sensible a l'optimització del cost del procés, i caldrà doncs ser estudiat.

Es realitza un experiment en el que s'avalua per una banda la capacitat d'expressar la proteïna d'interès segons la concentració d'IPTG que s'addicioni (Figura 8-14) i per l'altra l'efecte inhibitori que sobre la velocitat específica de creixement de l'organisme té el nivell d'inducció o la concentració d'IPTG (Figura 8-15).

L'experiment es duu a terme en erlenmeyers de 250 ml de volum emprant 50 ml de volum de treball, que són cultivats a 37°C i una velocitat d'agitació de 200 rpm. Els cultius s'inoculen a una concentració cel·lular de 0,1 g/L, i l'addició de l'inductor es realitza en l'instant inicial del cultiu per assegurar que no hi ha limitació de nutrients durant l'expressió. La quantitat d'IPTG que s'afegeix es calcula a partir de la quantitat total de la concentració cel·lular, ja que es pretén fixar una relació mmols IPTG per gram de pes sec, per després poder ser extrapolables als cultius d'alta densitat. La relació entre els mmols d'IPTG i la quantitat total de cèl·lules és calcula a partir del valor mitjà al llarg del cultiu.



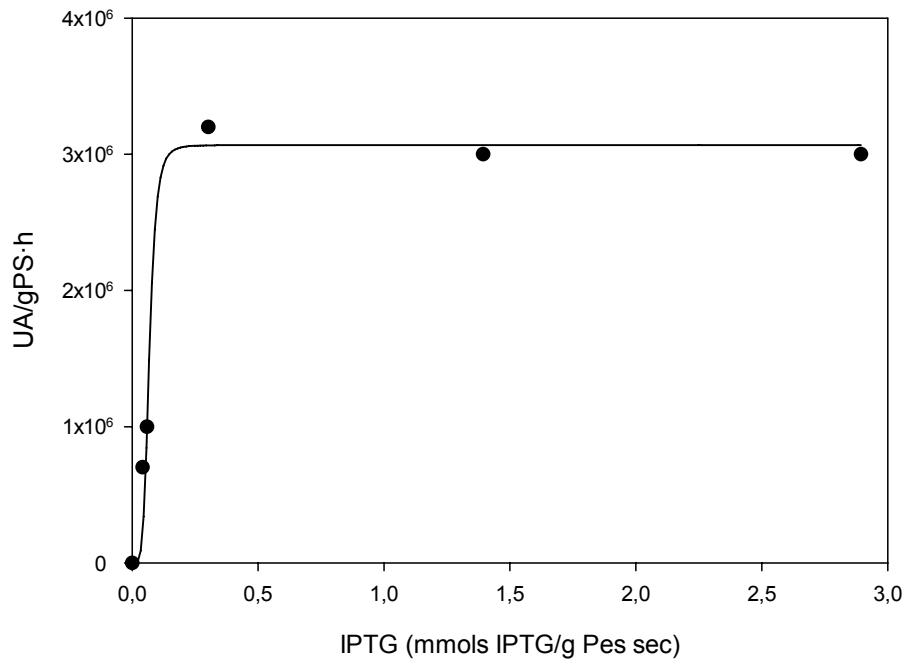
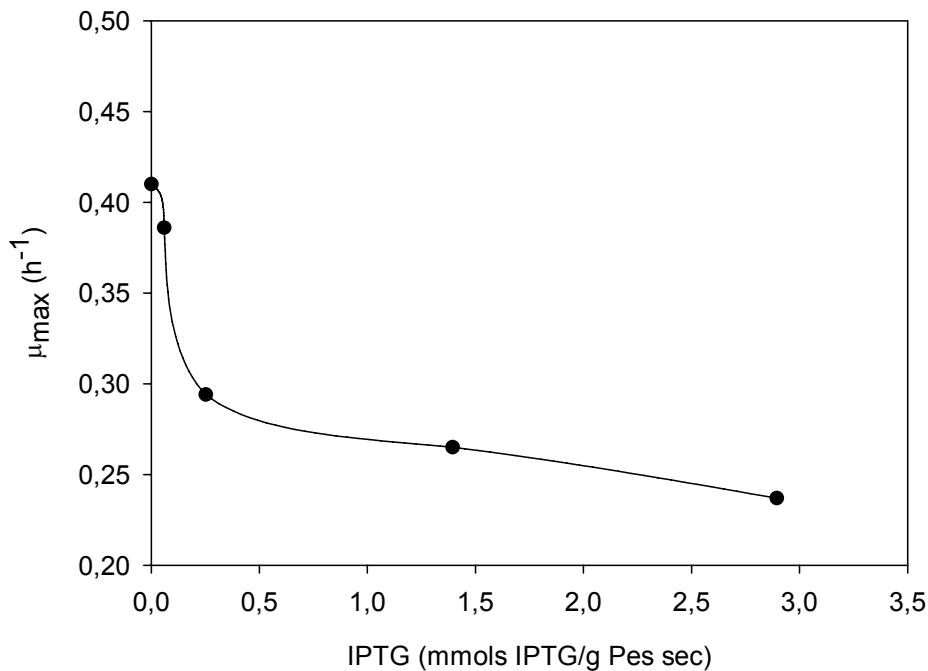


Figura 8-14: Avaluació del nivell d'expressió de  $\beta$ -galactosidasa de la soca M14 pTCO46- $\beta$ -gal segons la quantitat d'IPTG. La productivitat específica en UA/gPS h es relaciona amb la quantitat d'IPTG en mmols/ gPS.

La Figura 8-14 mostra la relació entre la productivitat específica de  $\beta$ -galactosidasa en funció de la quantitat d'IPTG. El perfil sigmoïdal mostra la clara saturació que es produeix en la productivitat específica a partir d'una concentració de 0,25-0,3 mmols d'IPTG/gPS, i a partir d'aquesta concentració d'IPTG, encara que se n'hi afegeixi en més quantitat, la productivitat específica es manté constant, mostrant una inducció completa del sistema d'expressió. Si s'observa el rang de concentració entre 0 i 0,25 mmols IPTG/gPS, es veu com la velocitat de variació de la productivitat específica és molt pronunciada, per la qual cosa un error en l'addició de l'inductor podria portar a uns nivells de productivitat més baixos dels esperats. En aquest tipus de funcions sempre és recomanable treballar a l'inici de la fase de saturació, però en aquest cas concret d'un metabòlit no assimilable per part de l'organisme, aquest risc desapareix i es possible treballar en qualsevol zona de la corba.



---

Figura 8-15: Efecte de la concentració d'inductor IPTG sobre la velocitat específica de creixement de la soca M15-pTCO46- $\beta$ gal, en relació a la concentració cel·lular.

---

L'altre aspecte a tenir en compte en el procés d'inducció és l'estrès metabòlic que pot patir el cultiu al derivar part dels recursos a la síntesi de la proteïna d'interès. L'estrès metabòlic es reflexa en una inhibició del cultiu, mostrant-se en una disminució del creixement. Aquesta anàlisi es mostra a la Figura 8-15, on s'avalua l'efecte de la concentració d'IPTG per gram de pes sec sobre la velocitat específica de creixement en cadascun dels casos. La velocitat específica de creixement disminueix de forma brusca a mesura que augmenta la proporció d'IPTG utilitzat. Així doncs, es pot afirmar que en els rangs de baixa quantitat d'IPTG, entre 0 i 0,15 mmols/gPS, a mesura que augmenta la quantitat d'IPTG afegida, augmenta també la productivitat específica, i proporcionalment a l'augment de productivitat, s'observa una disminució de la velocitat específica de creixement. Tenint en compte aquests resultats, s'ha de prendre una solució de compromís, i posteriorment comprovar també aquestes tendències en cultius d'alta densitat en el bioreactor, ja que alguns autors han observat canvis en el comportament en la inducció per IPTG en sistemes amb limitació de nutrients (Kweon *i col.*·2001).

A continuació es plantegen una sèrie de fermentacions d'alta densitat cel·lular que han estat induïdes a diferents concentracions d'IPTG. S'han anomenat inducció a baixa

concentració quan la quantitat d'IPTG afegida es situa al primer tram de la corba de la Figura 8-14 on la productivitat específica varia de forma proporcional a la quantitat d'IPTG (concentracions d'IPTG inferiors a 0,15 mmols/gPS), i inducció a altes concentracions d'IPTG a aquella concentració que se situa a l'inici de la saturació de la productivitat específica, on per més quantitat d'inductor que s'afegeixi no hi ha increment de productivitat.

### **Cultiu d'Alta Densitat Cel·lular induït a baixes concentracions d'IPTG.**

Conservant les condicions de cultiu descrites als apartats anteriors (a una temperatura de 37°C, un pH de 7,00, un cabal d'aeració entre 0,4 i 1,6 l/min (0,33 i 1,33 vvm) i una agitació entre uns valors de 300 i 1000 rpm, amb un valor de  $pO_2$  del 40% ), es procedeix a realitzar una sèrie d'experiments de CADC amb inducció al tram final del bioprocés. La Figura 8-16 mostra el primer cas estudiat que correspon a una inducció amb una quantitat d'inductor baixa, en concret de 0,042 mmols IPTG/gPS.

La fase inicial en discontinu té les característiques habituals que s'han pogut observar en els anteriors experiments. El cultiu s'inocula a 0,12 gPS/L i no s'observa fase de latència. La fase discontinua del cultiu no mostra anomalies respecte el que s'ha descrit anteriorment, i s'inicia la fase alimentada amb un valor de la limitació de la velocitat específica de creixement de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . A aquesta velocitat el cultiu es capaç de metabolitzar l'acetat acumulat durant la fase discontinua, i quan la presència d'acetat ha desaparegut totalment s'incrementa la velocitat específica fins a  $0,125 \text{ h}^{-1}$ , mantenint-se la concentració de subproducte a zero. En la fase final del bioprocés es torna a incrementar el valor de la  $\mu$  fins a  $0,15 \text{ h}^{-1}$  sense acumulació d'acetat.

Durant el cultiu hi ha hagut dues addicions manuals de fosfats a les 19 i a les 26 hores, per tal de mantenir la concentració de fosfats al brou de cultiu. Finalment, comentar que ha estat necessari l'aportació d' $O_2$  pur per a mantenir la concentració d'oxigen al medi tal i com s'ha comentat anteriorment en aquest mateix capítol.

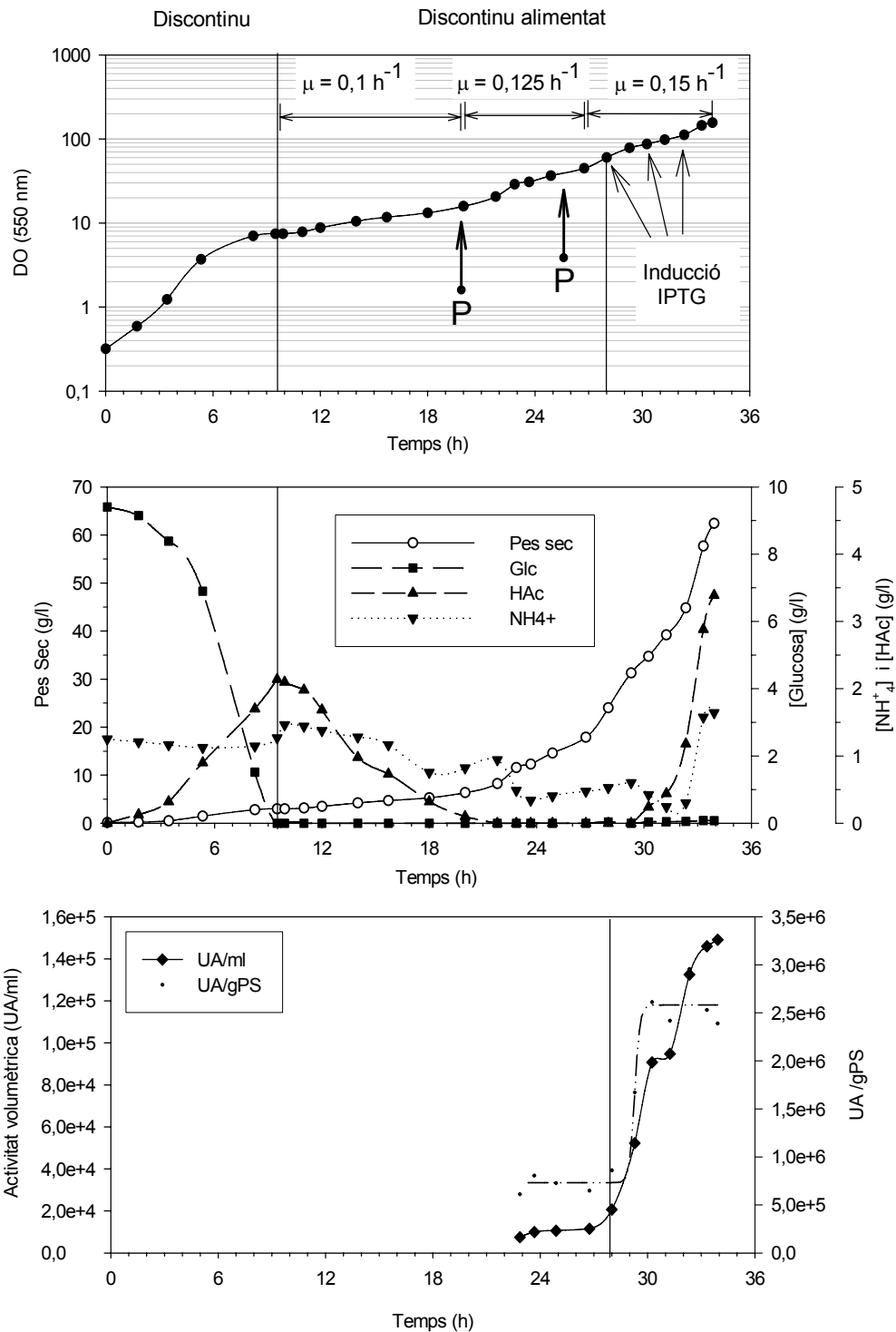


Figura 8-16: Experiment de cultiu en discontinuu alimentat de la soca M15 pTCO46-bgal (induïble per IPTG). Evolució de la velocitat específica de creixement en les diferents fases del cultiu (a dalt), de la concentració de cèl·lules, glucosa, acetat i amoni (al mig), i l'Activitat específica i Activitat volumètrica (a baix) amb el temps. La sageta ubicada sobre una lletra P indica una addició manual de la solució estoc de fosfats. La quantitat d'IPTG emprada és de  $[\text{IPTG}/\text{gPS}] = 0,042$  (mmols IPTG/ gPS), les addicions de l'inductor estan representades en sagetes obliqües.

La inducció del cultiu es realitza a les 28 hores de la inoculació, en l'última etapa del cultiu alimentat en discontinu, on s'assoleixen les màximes concentracions cel·lulars, i s'utilitza una concentració d'inductor situada en el rang baix, exactament amb una quantitat d'IPTG de 0,042 mmols IPTG/ gPS. La velocitat específica de creixement no varia respecte la que estava consignada prèviament a la inducció, per la qual cosa es decideix realitzar dues addicions més d'IPTG a les 31 i a les 33 hores. Les addicions a realitzar es calculen en base a la nova quantitat de cèl·lules generades des de l'última addició, per tal de mantenir constant la relació IPTG/gPS. Tot i les noves addicions es continua sense observar cap variació a la velocitat específica de creixement, fixada a  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . En l'estudi previ de la disminució de la  $\mu$  per efecte de la inducció, en aquest rang de concentració d'IPTG no hi havia una variació destacable, pel que es pot considerar aquest comportament normal.

En els perfils de metabòlits de la Figura 8-16, s'observa com després de unes 2-3 hores des de l'inici de la inducció es comença a acumular acetat en el brou de cultiu. Aquest fet pot ser degut a que la necessitat de sintetitzar la proteïna d'interès, l'organisme necessita més precursors de síntesi que en part són aportats a través dels metabòlits que conformen el cicle dels àcids tricarbòxílics, desequilibrant de nou les rutes metabòliques i col·lapsant la via d'entrada al CAT.

A nivell de proteïna produïda s'observa com la quantitat de proteïna produïda per gram de pes sec parteix d'un nivell basal de  $6 \cdot 10^5$  UA/gPS (Unitats d'Activitat/g de pes sec, calculades pel mètode de Miller, recollit al capítol de Materials i Mètodes) augmenta fins arribar a un valor constant de  $2,6 \cdot 10^6$  UA/gPS, moment en que el cultiu ha estat totalment induït i l'augment de concentració de proteïna en unitats volumètriques es deu únicament a l'augment de la concentració cel·lular en el brou de cultiu. En el present cas s'assoleix una concentració de proteïna (mesurada en Unitats d'Activitat) de  $1,5 \cdot 10^5$  UA/mL.

Respecte la productivitat volumètrica del cultiu, tenint en compte des de l'inici del cultiu, el valor final es de  $4,4 \cdot 10^3$  UA/mL·h, i si es considera només el període en que el cultiu ha estat induït el valor és de  $2,22 \cdot 10^4$  UA/mL·h (Taula 8-4). Mentre que el valor de la productivitat específica, considerant només la fase d'inducció, és de  $4,45 \cdot 10^5$  UA/gPS·h, valor considerablement més baix que el observat en els cultius en erlenmeyer que era de  $8,0 \cdot 10^5$  UA/g PS·h, indicant que l'eficiència de inducció en els cultius d'alta densitat cel·lular on el cultiu està limitat a nivell de substrats i de velocitat específica de creixement és menor. La limitació dels substrats per a evitar l'acumulació d'àcid acètic, suposa també una limitació en la maquinària biosintètica, i per tant de producció de la proteïna d'interès respecte els cultius no

limitats. Aquest comportament ja ha estat descrit prèviament en treballs anteriors (Kweon i col.·2001).

El segon experiment en aquesta sèrie de cultius amb inducció per IPTG és planteja una reducció de la quantitat d'IPTG a utilitzar, donat l'elevat preu de l'IPTG i per tant de la repercussió en l'economia global del procés. La concentració d'IPTG es pretén fixar a 0,03 mmols IPTG/ gPS, i es mantindrà constant mitjançant un seguit d'addicions durant la fase final del cultiu, com en el cas anterior.

Els resultats de l'experiment es mostren en la Figura 8-17, on s'observa els perfils habituals en la fase inicial en discontinu. La fase alimentada s'inicia amb un valor de limitació de la velocitat específica de creixement inicial conservatiu en el rang baix, concretament de  $0,05\text{h}^{-1}$ , i s'augmenta progressivament a mesura que l'acetat és consumit, passant a ser de  $0,1\text{h}^{-1}$  a les 4 hores iniciada la fase alimentada, i finalment, s'augmenta a  $0,125\text{h}^{-1}$  vuit hores després.

Els nivells de concentracions cel·lulars obtinguts i l'evolució de la concentració dels principals substrats i metabòlits són també els esperats, observats també en els experiments anteriors, assolint-se uns valors de concentració de glucosa i d'àcid acètic propers a zero.

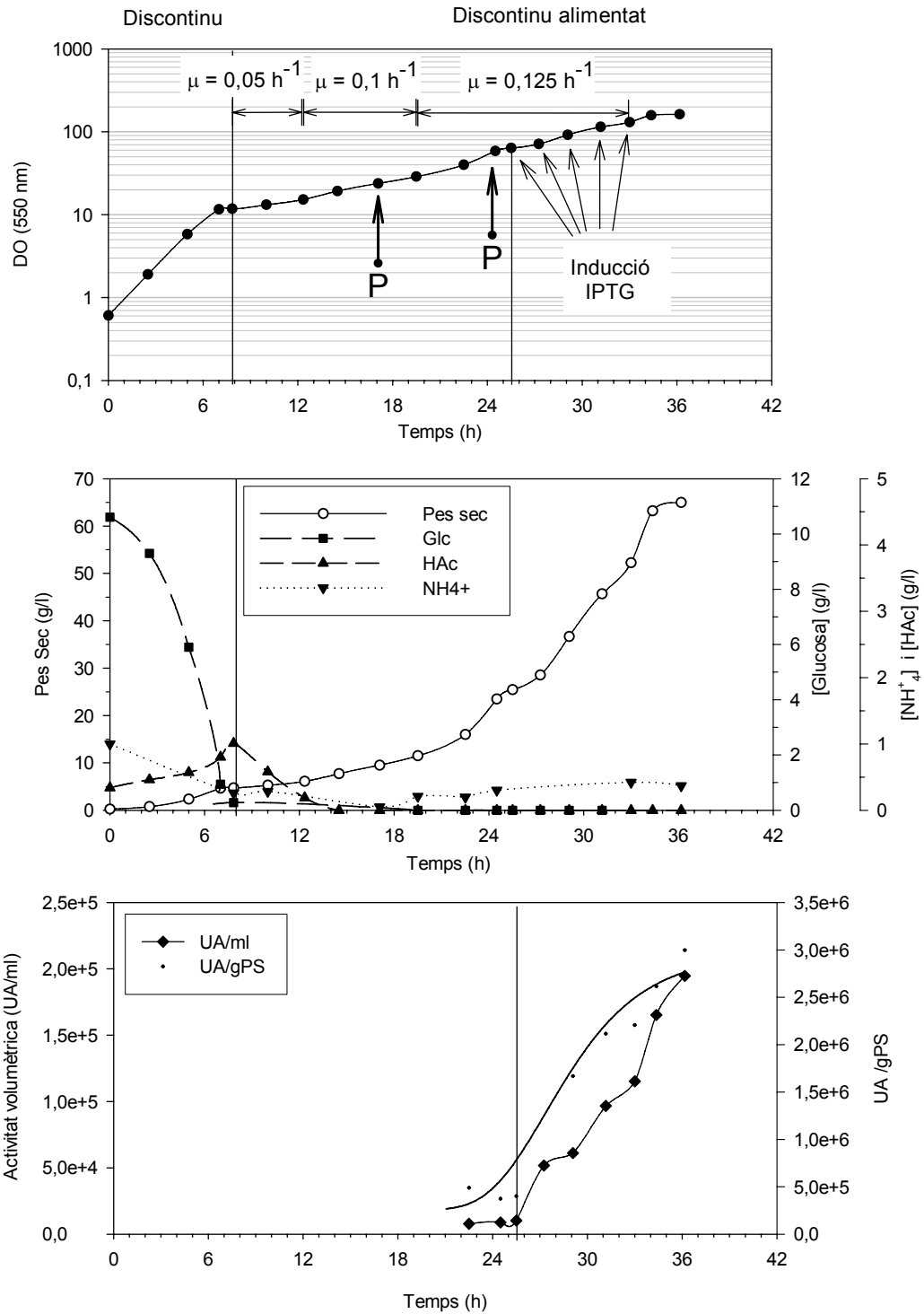


Figura 8-17: Experiment de cultiu en discontinuu alimentat de la soca M15 pTCO46-bgal (indueïble per IPTG). Evolució de la velocitat específica de creixement en les diferents fases del cultiu (a dalt), de la concentració de cèl·lules, glucosa, acetat i amoni (al mig), i l'Activitat específica i Activitat volumètrica (a baix) amb el temps. La sageta ubicada sobre una lletra P indica una addició manual de la solució estoc de fosfats La quantitat d'IPTG emprada és de [IPTG/gPS] = 0,03 (mmols IPTG/ gPS), i les addicions de l'inductor estan representades en sagetes obliqües.

Pel que fa a la fase d'inducció, s'inicia a les 25,5 hores post-inoculació, i s'addiciona IPTG a una concentració de 0,03 mmols IPTG/gPS. Per tal de mantenir la concentració d'IPTG constant al llarg de tota la inducció es realitzen addicions seriades cada vegada que s'extreu una mostra, addicionant la quantitat d'inductor proporcional a 0,03 mmols IPTG per gram de pes sec generat en cada període de temps.

De la mateixa manera que en el cas anterior no s'observen els resultats esperats, ja que la velocitat específica de producció és de  $2,3 \cdot 10^5$  UA/gPS·h, quan el valor esperat hauria de ser proper a  $5 \cdot 10^5$  UA/gPS·h, per tant la inducció ha resultat molt més baixa del que seria d'esperar, al tractar-se d'un cultiu que està limitat per substrats, com ja s'ha comentat amb anterioritat.

Els perfils de metabòlits de la Figura 8-17 no mostren cap acumulació d'acetat en la fase d'inducció, al contrari del que s'havia pogut observar en el cas anterior. Aquest experiment es situa en un estat més suau d'inducció, i s'observa que no s'ha produït estrès per la biosíntesi de la proteïna. És a dir, l'augment de la demanda de precursors de síntesi i d'energia és menor, degut a la velocitat de síntesi de la proteïna d'interès també és menor, i no suposa la necessitat per part de l'organisme d'activar la reacció de transformació d'AcetilCoA a àcid acètic, com si havia succeït en el cas anterior. La no acumulació de l'acetat permet perllongar el cultiu per un període més extens, ja que no hi ha inhibició ni del creixement de l'organisme ni risc d'inhibició de l'expressió de la proteïna per la presència d'acetat, per tant tot i que la productivitat específica sigui menor, permet obtenir uns valors de concentració de proteïna tant a nivell volumètric com per gram de pes sec majors que el cas anterior.

### **Cultiu d'Alta Densitat Cel·lular induït a altes concentracions d'IPTG.**

D'acord amb el plantejament abans esmentat, és planteja un nou experiment emprant una concentració alta d'inductor. La quantitat d'IPTG a addicionar correspondrà a la concentració més baixa possible que ha mostrat una productivitat específica màxima en els assaigs preliminars, aproximadament de 0,3 mmols/g PS calculats en el moment de la inducció. En aquest cas es decideix addicionar puntualment l'inductor segons la concentració cel·lular present en el moment concret, és a dir, el paràmetre correspondrà a la concentració volumètrica constant [IPTG]/mL (Figura 8-18), degut a la gran quantitat d'IPTG necessària. Aquest cultiu tot i que a priori hauria de suposar un augment del cost del producte, es realitza amb la intenció de poder realitzar un anàlisi comparatiu amb els casos anteriors, i esbrinar el



paper que juga l'IPTG en la inducció de la proteïna, i en el comportament metabòlic de l'organisme.

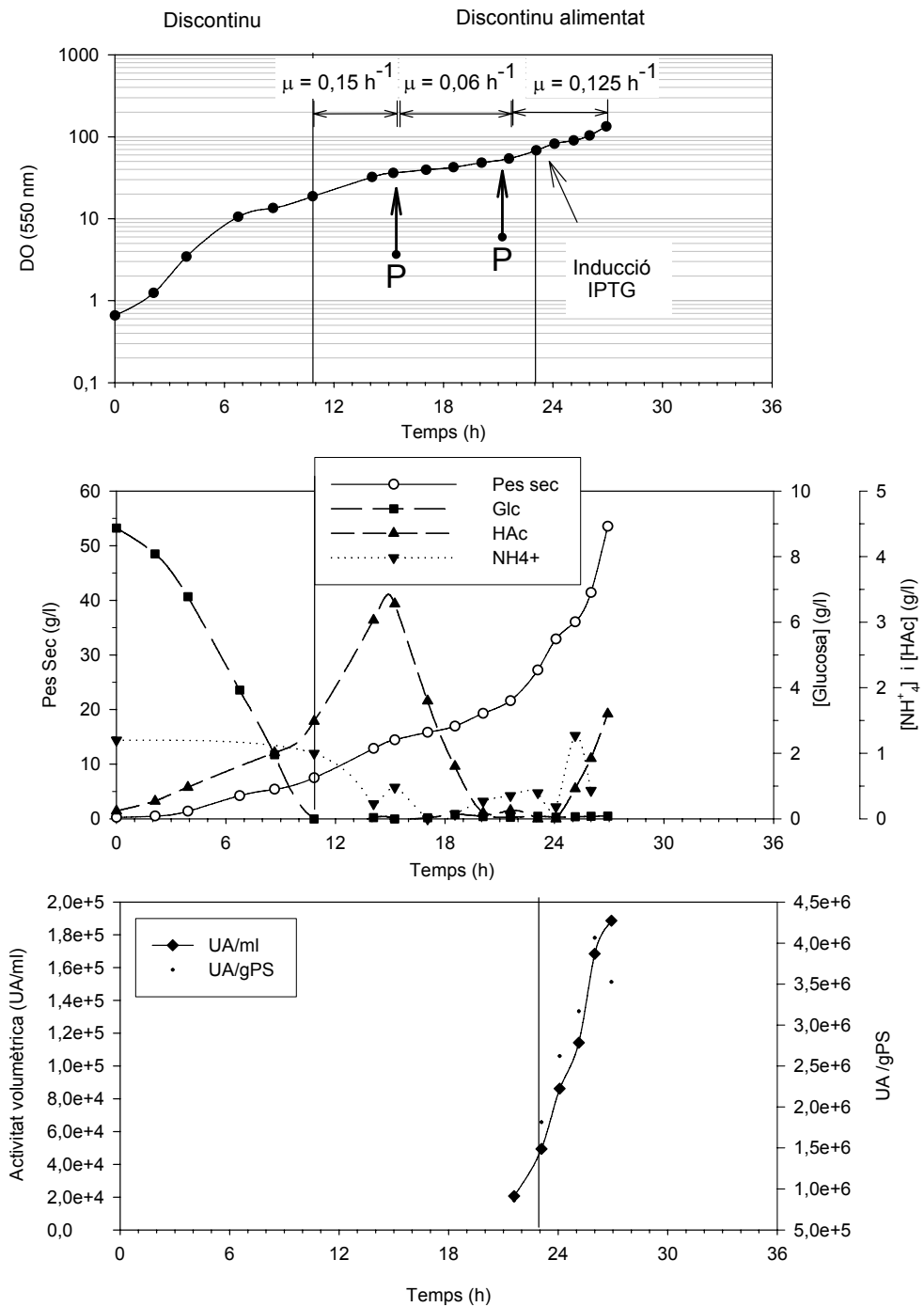


Figura 8-18: Experiment de cultiu en discontinu alimentat de la soca M15 pTCO46-bgal (induïble per IPTG). Evolució de la velocitat específica de creixement en les diferents fases del cultiu (a dalt), de la concentració de cèl·lules, glucosa, acetat i amoni (al mig), i l'Activitat específica i Activitat volumètrica (a baix) amb el temps. La sageta ubicada sobre una lletra P indica una addició manual de la solució estoc de fosfats La quantitat d'IPTG emprada és de [IPTG] = 8 mmols IPTG/L realitzada en una sola inducció.

El cultiu es desenvolupa sota les condicions descrites en els altres casos, a una temperatura de 37°C, un pH de 7,00, un cabal d'aeració entre 0,4 i 1,6 l/min (0,33 i 1,33 vvm) i una velocitat d'agitació entre 300 i 1000 rpm, per a mantenir un valor de pO<sub>2</sub> del 40%.

El cultiu s'inocula a 0,17 gPS/L, i no s'observa fase de latència. La fase discontinua del cultiu no mostra anomalies respecte el que s'ha descrit anteriorment, i s'inicia la fase alimentada amb un valor de la limitació de la velocitat específica de creixement de 0,15 h<sup>-1</sup>. Des de l'inici de la fase alimentada s'observa una acumulació d'àcid acètic, que es corregeix disminuint la velocitat específica de creixement fins a 0,06 h<sup>-1</sup> forçant que aquest sigui consumit de nou. La concentració d'acetat arriba a un valor de 3,5 g/L, proper al límit descrit com a inhibidor, moment en que es redueix el valor de la  $\mu$  a 0,06 h<sup>-1</sup>, per a permetre l'assimilació del subproducte. En el moment que la concentració d'acetat es nul·la s'incrementa de nou la velocitat específica de creixement fins a 0,125 h<sup>-1</sup>, mantenint-se la mateixa concentració del subproducte mentre no hi ha inducció. Aquest fet corrobora la possibilitat de controlar l'evolució dels metabòlits en el brou de cultiu, modificant únicament la velocitat específica de creixement.

Durant el cultiu es realitza una addició manual de fosfats a les 19 hores, per a restablir la concentració de fosfats al brou de cultiu. Finalment comentar que una vegada més ha estat necessari l'aportació d'O<sub>2</sub> pur.

En aquest cas, i igual que en el primer cultiu presentat (Figura 8-16) durant el procés d'inducció es produeix una reorganització del metabolisme i una acumulació d'acetat, però a una velocitat superior, ja que la inducció es realitza amb les mateixes concentracions cel·lulars, i després de només 4 hores d'iniciar-se la inducció en el primer cas s'arriba a acumular fins a 1g/L (0,042 mmolsIPTG/gPS), i en el segon cas supera 1,5 g/L (8 mM).

Les dades d'inducció obtingudes en aquestes condicions són superiors respecte els dos casos anteriors, s'assoleix una concentració de producte en el brou de cultiu de 1,89·10<sup>5</sup> UA/mL, i si es mesura en funció de la concentració cel·lular el valor és de 3,7·10<sup>6</sup> UA/g PS.

La productivitat específica calculada torna a ser inferior a l'obtinguda prèviament en els cultius en erlenmeyer sense limitació de substrats. En el reactor la productivitat específica és de 7,09·10<sup>5</sup> UA/gPS·h, mentre la que es va observar en els estudis preliminars sense limitació fou de 3·10<sup>6</sup> UA/g PS·h. En aquest cas s'ha de considerar que s'ha treballat a una concentració volumètrica d'IPTG constant, però no a nivell de concentració cel·lular. Si prenem la mitjana de relació entre la quantitat de inductor i la concentració cel·lular entre l'inici i el final

de la fase d'inducció, s'obté el valor de 0,15 mmols IPTG/ gPS el valor de la productivitat específica correspondria aproximadament de  $2 \cdot 10^6$  UA/g PS·h, gairebé el doble del que s'observa en el cultiu limitat.

La productivitat volumètrica és de  $3,32 \cdot 10^4$  UA/mL h, considerant només el període una vegada inicialitzada la inducció.

Per recapitular l'estudi s'elabora la Taula 8-4, on es recull els valors de producció de la proteïna utilitzant una *Escherichia coli* amb un plasmidi que disposa d'un promotor induïble per IPTG, junt amb les dades més significatives dels diferents cultius d'alta densitat cel·lular, que han estat induïts a concentracions cel·lulars comparables, entre 24 i 26 gPS/L,.

	Productivitat Volumètrica	Productivitat Específica	Activitat volumètrica final	Activitat específica final
	UA/mL·h	UA/gPS·h	UA/mL	UA/gPS
0,03 mmols IPTG/ g PS	1,65E+04	2,30E+05	1,95E+05	3,00E+06
0,042 mmols IPTG/ g PS	2,22E+04	4,45E+05	1,49E+05	2,60E+06
0,8 mmols IPTG/ ml [IPTG] <sub>mitjà</sub> = 0,15mmols/g PS	3,32E+04	7,09E+05	1,89E+05	3,70E+06

Taula 8-4: Recull de les dades de productivitat dels cultius en bioreactor d'alta densitat cel·lular de la soca M15 pTCO46-βgal induïdes mitjançant diferents quantitats d'IPTG. Es mostren les dades de productivitats i d'activitat del producte total final.

Una comparació dels valors a nivell de producció de la proteïna d'interès, sense entrar en l'anàlisi econòmic que s'estudiarà posteriorment, mostra com a mesura que es disminueix la concentració d'IPTG addicionada, les productivitats volumètriques i específiques disminueixen progressivament. Si es compara el valor de productivitat específica que s'ha obtingut en erlenmeyer en condicions de cultiu sense limitació, les obtingudes en els cultius en bioreactor són de l'ordre de la meitat pel cas del rang baix de concentració d'IPTG, i entre 2 i 3 vegades les que utilitzen una concentració en el rang alt d'IPTG, fet que com ja s'ha comentat, apunta a ser degut a les condicions limitants del creixement en les que es desenvolupa la inducció.

En canvi, si es compara els valors obtinguts a nivell d'activitat volumètrica final les diferències no són tant pronunciades. Inesperadament, la concentració volumètrica més

elevada es dona en el cas d'una concentració d'inductor més baix, amb un valor similar al del rang alt de concentració d'IPTG (8mM),  $1,95 \cdot 10^5$  UA/mL i  $1,89 \cdot 10^5$  UA/mL respectivament. No obstant aquest resultat s'inverteix si es considera l'activitat específica de producte, és a dir, la quantitat de proteïna que s'ha generat per gram de pes sec de cultiu, obtenint-se uns valors de  $3,7 \cdot 10^6$  UA/gPS per l'alta concentració d'IPTG, i  $3,0 \cdot 10^6$  UA/gPS pel cas amb menor quantitat d'inductor.

Com es pot observar, tot i que en el cas de la concentració més baixa d'IPTG (0,03 mmols/gPS) la productivitat específica és menor, aquest fet es veu compensat per l'assoliment d'una major concentració cel·lular, de manera que la concentració de producte en termes de concentració volumètrica acaba sent major. És interessant observar que aquesta major concentració cel·lular s'obté només en el cas en que no es produeix acumulació d'àcid acètic durant la fase d'inducció, fet que pot suggerir que una concentració d'IPTG baixa, és a dir realitzar una inducció suau, no altera de forma notable el comportament del cultiu.

La Figura 8-19 mostra la relació directe que hi ha entre la velocitat específica de síntesi de la proteïna d'interès, i la velocitat específica de excreció dels subproductes d'oxidació incompleta, que a la vegada es relaciona amb la concentració d'inductor emprada (IPTG), i del diferent nivell de la càrrega metabòlica que aquest genera.

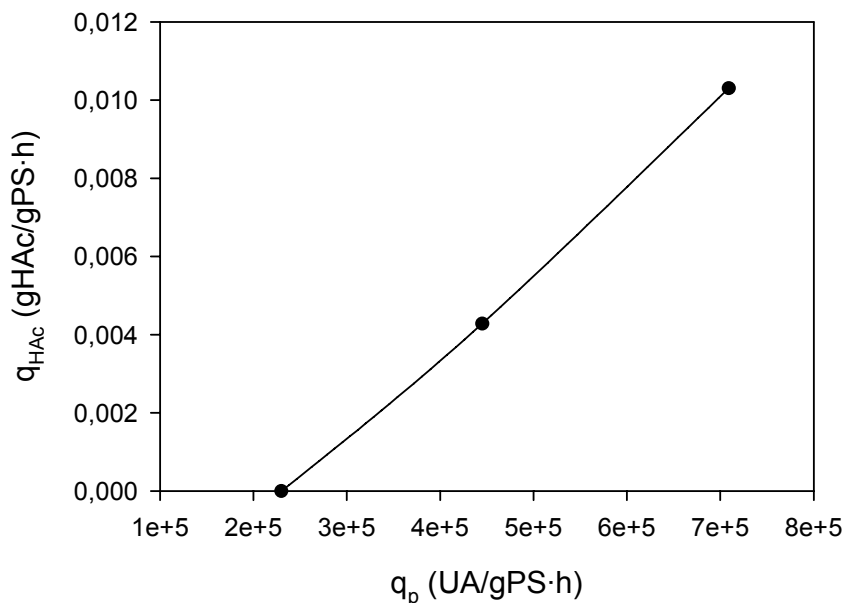


Figura 8-19: Relació entre la velocitat específica de producció de subproductes d'oxidació incompleta, l'àcid acètic, i la velocitat específica de producció de la proteïna d'interès, a partir de les dades recollides als diferents experiments discontinus alimentats d'*E.coli* M15 pTCO46- $\beta$ gal en que s'ha emprat diferents concentracions d'IPTG.

S'observa una disminució de la velocitat d'excreció d'àcid acètic a mesura que disminueix la velocitat de síntesi de la proteïna, arribant a nivells nuls quan la concentració d'IPTG emprada és de 0,03 mmols/g PS, que suposa una velocitat de específica de producció de  $2,3 \cdot 10^5$  UA/g PS·h. Aquest fet es reflecteix en el cultiu en una acumulació del subproducte que condueix a una inhibició no tan sols de la velocitat de creixement de cultiu, sinó en una inhibició de l'expressió de la proteïna. A més, de manera indirecta també suposa una menor durada del cultiu induït, i per tant la concentració de biocatalitzador final pot ser menor.

Així doncs, quan es dissenyi un bioprocés que empri *E.coli* amb la incorporació d'un plasmidi induïble per IPTG, s'ha de tenir en compte que la quantitat d'inductor a addicionar influeix directament en el cost del medi d'inducció i per tant del bioprocés, però que a més aporta altres avantatges com permetre mantenir el cultiu més temps induït, i per tant, assolir una concentració cel·lular més elevada, i conseqüentment, una productivitat volumètrica que podria ser major.

### **Cultius en discontinu alimentat de la soca M15-pJCO46-βgal induïda per temperatura.**

Explorada la possibilitat de producció d'una proteïna emprant com a vector d'expressió un bacteri, l'*Escherichia coli* transformada amb el plasmidi pTCO46-βgal induïble per IPTG, es proposa explorar la possibilitat d'emprar el mateix bacteri però transformat amb el vector pJCO46-βgal, que compte amb l'avantatge de ser un vector induïble per un augment de temperatura del cultiu, de manera que pot reduir el cost de la producció al no haver d'utilitzar un producte car com és l'IPTG. El vector pJOC46-βgal expressa el gen *lac z* sota el control dels promotors en tàndem pL i pR del bacteriòfag lambda. L'expressió està regulada pel repressor termosensible codificat pel gen *cl857ts*, que s'inactiva la seva transcripció per temperatura (a partir de 28°C). A partir d'aquesta temperatura i fins a 42°C, el repressor inactivat permet l'inici de la transcripció, i per tant, la síntesi de la proteïna recombinant insertada en el plasmidi.

L'estratègia de cultiu emprada és la mateixa que s'ha descrit per a els cultius de la soca pTCO46-βgal pel que fa a la fase de creixement cel·lular, dividida en una discontinua i una discontinua alimentada, així com també es conserven les condicions i les diferents metodologies emprades pel control de pH i de pO<sub>2</sub>. Els resultats es mostren a la Figura 8-20.

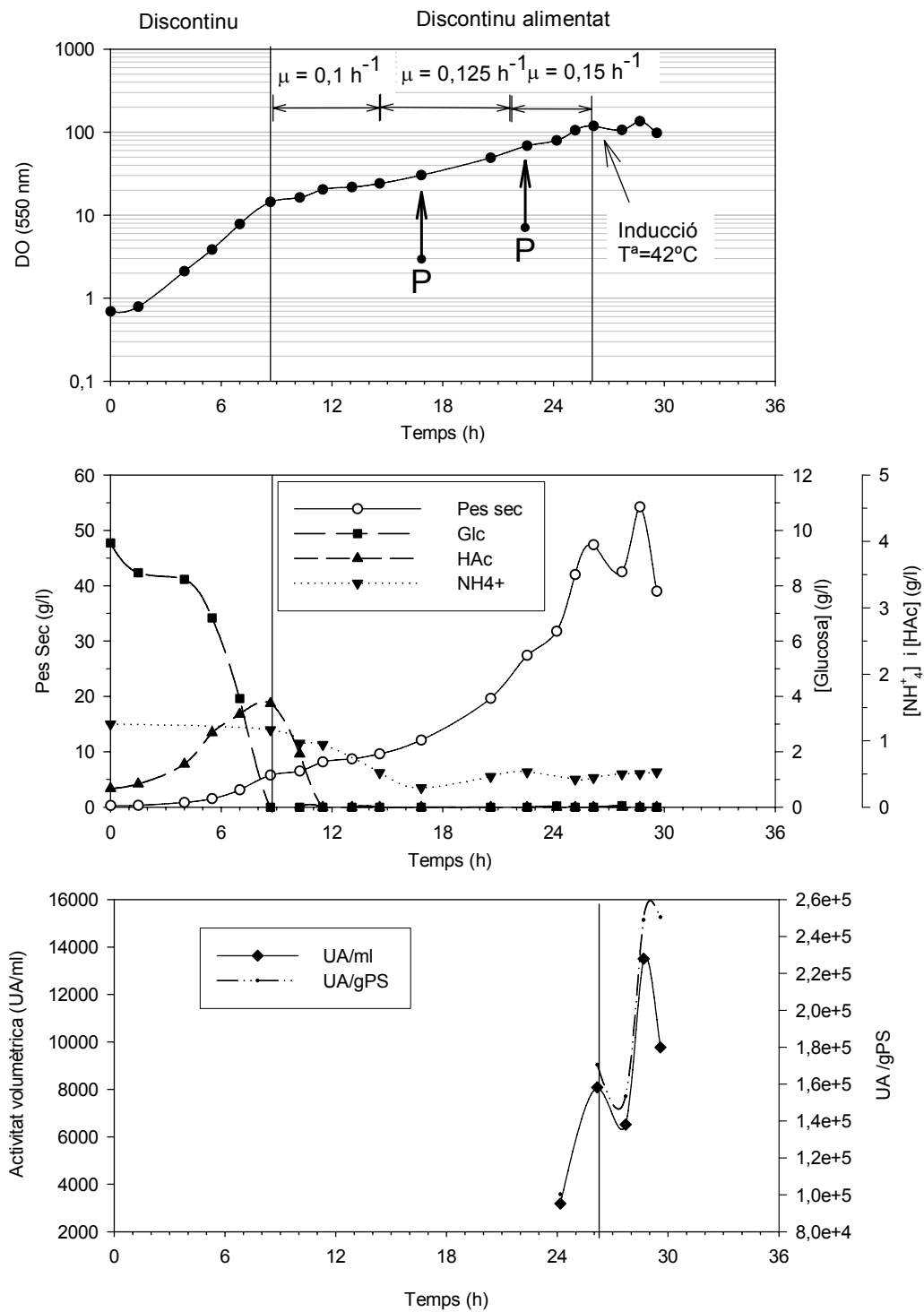


Figura 8-20: Discontinuu alimentat de la soca pJCO46-bgal (inducible per  $T^a$ ). El cultiu s'ha realitzat a  $37^\circ\text{C}$  fins el moment de la inducció que s'augmenta la  $T^a$  fins a  $42^\circ\text{C}$ . [FB\_EC\_M9]

La fase discontinua de creixement presenta una petita fase de latència tot i haver-se inoculat el cultiu amb una concentració cel·lular de 0,15 gPS/L, però el cultiu es recupera

correctament. No obstant, el cultiu es recupera correctament arribant a una concentració cel·lular de 3,2 gPS/L al inici de la fase alimentada.

L'addició de medi concentrat s'inicia amb un valor limitat de la velocitat específica de creixement de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , que es manté fins a la total desaparició de l'acetat del brou de cultiu. Posteriorment, és incrementada fins un valor de  $0,125 \text{ h}^{-1}$  durant un període de 7 hores i finalment, s'augmenta el seu valor fins a  $0,15 \text{ h}^{-1}$ , mantenint-se nul·la concentració d'acetat i un nivell d'amoni inferior a  $1 \text{ g/L}$ . Paral·lelament a l'arrencada del perfil prefixat d'addició de substrats, es posa en marxa l'enriquiment del corrent d'aeració amb oxigen pur, tal i com ha estat descrit amb anterioritat. Durant el cultiu ha estat necessària l'addició de fosfats en dues ocasions, representades en el gràfic per una fletxa vertical

Al assolir-se una concentració cel·lular prou elevada, al voltant d'una concentració cel·lular de 45 gPS/L, s'inicia la fase d'inducció. La inducció es realitza consignant a la Unitat Digital de Control, un increment de la temperatura fins a  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al incrementar la temperatura del cultiu s'observa una baixada de la solubilitat del oxigen en el brou de cultiu, manifestant-se en una forta baixada del  $\text{pO}_2$  que força a incrementar el cabal d'oxigen que enriqueix el corrent d'aeració fins a un valor de  $0,16 \text{ l/min}$ , equivalent a  $0,12 \text{vvm}$  gairebé 5 vegades més que el màxim que s'havia emprat en les fermentacions amb la soca pTCO46- $\beta$ gal.

La Figura 8-20 mostra com l'increment de temperatura sobtat provoca una xoc tèrmic al cultiu, mostrant una davallada en la densitat òptica, així com un lleuger augment d'escumes, manifestació habitual al produir-se una certa lisi cel·lular. A les quatre hores d'iniciar-se la inducció, s'observa una altra vegada una baixada de la concentració cel·lular i l'extracció de la mostra denota un brou de cultiu d'una viscositat notable, degut possiblement a l'alliberament del DNA del bacteri, moment en que es decideix aturar el cultiu.

Analitzant les dades del resultat de la inducció s'obté un valor de la productivitat específica de  $2,89 \cdot 10^4 \text{ UA/g PS}\cdot\text{h}$  i una productivitat volumètrica de  $2289 \text{ UA/mL}\cdot\text{h}$ . Si es comparen aquests valors amb els que s'han obtingut amb la soca induïble per IPTG són de l'ordre de 10 vegades inferiors respecte els valors de producte final obtingut, essent de  $1,6 \cdot 10^4 \text{ UA/mL}$  per l'activitat volumètrica de producte i de  $2,2 \cdot 10^5 \text{ UA/gPS}$  per l'activitat específica, mantenint-se la disminució de 10 vegades en el millor dels casos.

Altres treballs publicats que han emprat promotors de *E. coli* induïbles per temperatura, mostren resultats diferenciats. Una comparació directe de la mateixa soca (K12), emprant un plasmidi induïble per temperatura i un altre per IPTG, indiquen que el primer cas

s'aconsegueix gairebé 10 vegades més productivitat específica de la proteïna d'interès (factor humà de creixement de fibroblasts, bFGF) (Seeger *i col.*·1995). Però un anàlisi més exhaustiu mostra com produint-se la inducció disposant de la mateixa concentració cel·lular al brou, al induir per xoc tèrmic, el creixement de les cèl·lules resulta frenat contundentment, passant de 45 g PS/L fins a 61 g PS/L, mentre que en el cas d'inducció per IPTG el cultiu creix des de 41 fins a 135 g PS/L. Això permet recalculer el valor de concentració volumètrica que passa a ser de 4,8 g/L i 1,1 g/L de bFGF, per a l'induït per Temperatura i IPTG respectivament. A més a més, en el mateix article cita que la inducció per temperatura, comporta que una tercera part de la proteïna expressada està en forma de cossos d'inclusió, fet que complica i baixa els rendiments de purificació. Si corregim el valor de productivitat volumètrica, restant la proteïna no soluble, els valors de concentració volumètrica de producte són de 3,2 g/L i 1,1 g/L, per temperatura i IPTG respectivament. Tot i que finalment, el millor resultat s'obté amb la inducció per temperatura, l'augment de diferència del procés productiu passa a ser de 10 vegades a 3 vegades superior.

Per altra banda hi ha un seguit de característiques que compliquen el desenvolupament d'estratègies de cultiu amb inductors que empren el xoc tèrmic, com és la disminució de la solubilitat del oxigen dissolt al augmentar la temperatura, fet que obliga a emprar cabals d'oxigen pur molt superiors i limita la concentració cel·lular assolible, que juntament amb un increment de l'activitat respiratòria sota condicions d'inducció (Hoffmann i Rinas·2000; Schmidt *i col.*·1999), afegeixen complexitat al bioprocés que s'incrementen al augmentar l'escala de producció.

Els resultats obtinguts amb la soca M15-pJCO46- $\beta$ gal induïble per temperatura són desfavorables en front dels obtinguts anteriorment amb la soca induïble per IPTG la M15-pTCO46- $\beta$ gal, quan s'empra estratègies d'alta densitat cel·lular, desemboquen a abandonar aquesta línia de desenvolupament. La viabilitat d'aquest tipus de constructes (induïbles per xoc tèrmic) mostren bons resultats a nivell de laboratori, i permeten estalviar l'ús d'IPTG, principal cost dels medis de cultiu dels sistemes que empren el promotor *lac z*, però la complexitat o limitacions físico-químiques que aporten al bioprocés, d'augment de despesa energètica i sobretot d'oxigen pur, fan que siguin processos amb certes limitacions quan es volen dur a terme a escala industrial.



## **8.4. Bibliografia.**

Akesson, M; Hagander, P i Axelsson, JP. 2001. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology and Bioengineering*. 73:223-230.

Bailey, JE i Ollis, DF. 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Co. New York.

Bech-Jensen, E i Carlsen, S. 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*. Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnology and Bioengineering*. 36:1-11.

Bentley, WE; Davis, RH i Kompala, DS. 1991. Dynamics of Induced cat Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 38:749-760.

Brown, SW; Meyer, HP i Fiechter, A. 1985. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23:5-9.

Durany, O; Mas, C i Lopez-Santin, J. 2005. Fed-batch production of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*. 40:707-716.

Fuchs, C; Koster, D; Wiebusch, S; Mahr, K; Eisbrenner, G i Markl, H. 2002. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 93:243-251.

Gottschalk, G. 1979. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag. New York.

Han, K; Lim, HC i Hong, J. 1992. Acetic-Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 39:663-671.

Hoffmann, F. i Rinas, U. 2000. Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16:1000-1007.

Holms, WH. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Review*. 19:85-116.

Horn, U; Strittmatter, W; Krebber, A; Knupfer, U; Kujau, M; Wenderoth, R; Muller, K; Matzku, S; Pluckthun, A i Riesenberger, D. 1996. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46:524-532.

Korz, DJ; Rinas, U; Hellmuth, K; Sanders, EA i Deckwer, WD. 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 39:59-65.

Kweon, DH; Han, NS; Park, KM i Seo, JH. 2001. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 36:537-542.

Macaloney, G; Draper, I; Preston, J; Anderson, KB; Rollins, MJ; Thompson, BG; Hall, JW i McNeil, B. 1996. At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Food and Bioproducts Processing*. 74:212-220.

Maniatis, T; Fritsch, EF i Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Nakano, N; Rischke, M; Sato, S i Märkl, H. 1997. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in dialysis reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 48:597-601.

Riesenber, D. 1991. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology and Bioengineering*. 2:380-384.

Riesenber, D; Schulz, V; Knorre, WA; Pohl, HD; Korz, D; Sanders, EA; Ross, A i Deckwer, WD. 1991. High Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli* at Controlled Specific Growth-Rate. *Journal of Bacteriology*. 20:17-28.

Rinas, U; Kracke-Helm, HA i Schrögerl, k. 1989. Glucose as a substrate in *Escherichia coli* recombinant strain fermentation technology. *Applied Microbiology Biotechnology*. 31:163-167.

Schmidt, Michael; Babu, KunnelRaman; Khanna, Navin; Marten, Sabine i Rinas, Ursula. 1999. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 68:71-83.

Seeger, Anke; Schneppe, Bernard; McCarthy, John E. G.; Deckwer, Wolf-Dieter i Rinas, Ursula. 1995. Comparison of temperature- and isopropyl-[beta]-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:947-953.

Suarez, D.C i Kilikian, B.V. 2000. Acetic acid accumulation in aerobic growth o recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemical*. 35:1051-1055.

Vidal, Luis. 2006. Producció de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vila, Pau. 2001. Enginyeria metabòlica de cèl·lules d'*E.coli*. Efecte sobre el creixement, el consum de glucosa i la secreció de subproductes. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Wilms, B; Hauck, A; Reuss, M; Syldatk, C; Mattes, R; Siemann, M i Altenbuchner, J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering*. 73:95-103.

Yee, L i Blanch, HW. 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 41:781-790.



**9. ANÀLISI DELS BIOPROCESSOS I  
AVALUACIÓ ECONÒMICA.**



## **9.1. Introducció.**

En aquest treball s'ha intentat realitzar una àmplia aproximació a la producció d'un candidat vacunal per a la malaltia de Gumboro en aus, de forma que s'ha treballat en quatre sistemes diferents, un de producció de vacunes convencionals (producció de virus IBD mitjançant la infecció de cèl·lules *Vero*), i tres possibilitats diferents de producció de la proteïna VP2 de la càpsida del virus IBD recombinant (*baculovirus* recombinants que infecten cultius de Sf9, així com *Pichia pastoris* i *Escherichia coli* recombinants amb construccions per a la producció de la mateixa proteïna heteròloga). No obstant, l'aplicació pràctica d'alguna d'aquestes opcions no depèn només dels aspectes tècnics, sinó també dels econòmics. Per aquesta raó s'ha considerat oportú estudiar en aquest capítol l'anàlisi dels diferents bioprocessos que es poden derivar dels quatre sistemes d'expressió estudiats, i fer-ne també una avaluació econòmica, de manera que permeti la seva comparació en termes de viabilitat econòmica. D'aquesta manera, és vol aconseguir obtenir una visió més àmplia del treball efectuat. Cal dir en aquest sentit que en dos dels quatre sistemes provats no s'ha pogut arribar a expressar la proteïna recombinant VP2 o bé fer-ho de forma estable, degut a un seguit de limitacions dels sistemes explorats que ja han estat discutits en els capítols corresponents. No obstant, sí que s'ha demostrat en aquests sistemes la capacitat d'expressió d'una altra proteïna, la  $\beta$ -galactosidasa, que permet establir uns paràmetres de referència a partir dels quals es possible realitzar una sèrie d'extrapolacions per a procedir a l'avaluació del sistema. En tot cas, s'ha considerat molt interessant continuar fent l'anàlisi econòmica dels quatre casos, ja que els resultats de la mateixa poden indicar fins a quin punt pot ser d'interès o no l'estudi més intensiu dels processos en els que no s'ha pogut obtenir l'expressió estable de VP2.

Aquest estudi es realitza amb l'ajuda d'un programari de simulació i càlcul de plantes de producció biotecnològiques anomenat Superpro Designer (Intelligen Inc.), que requereix que prèviament es defineixi el bioprocés escollit per a cada un dels microorganismes i els paràmetres que els caracteritzen (en cas de no disposar de dades, com en la *Pichia pastoris*, els paràmetres s'hauran de fixar en base a extrapolacions). De la mateixa manera s'haurà d'assumir altres suposicions com per exemple la capacitat de resposta immunològica de la proteïna de fusió expressada amb *E. coli*, la VP2-DHFR, com s'exposarà amb més detall.

## **9.2. Definició de les variables de disseny dels bioprocessos.**

El primer pas o la primera variable que s'ha de fixar en la definició d'un bioprocés és la quantitat de producte que es vol generar i dur al mercat, que es fixa a partir de l'estudi del mercat existent i fixant una determinada quota objectiu d'aquest mercat.

Com ja s'ha comentat en la introducció inicial, la malaltia de Gumboro està estesa gairebé per tot el món, i ara per ara la vacunació i les mesures higièniques són les úniques eines per a evitar la propagació d'aquesta malaltia. Així doncs, el mercat potencial absolut representaria el mercat mundial, del qual només Europa genera una necessitat d'administració de  $5 \cdot 10^9$  dosis/any. Per tal de realitzar un estudi significatiu, s'assumeix com a quota de mercat una desena part del mercat europeu, és a dir, unes vendes de  $5 \cdot 10^8$  dosis/any.

Com a criteri general per afrontar la definició dels diferents bioprocessos, i el seu dimensionament, s'inicia el disseny per l'equip principal de producció, el bioreactor, en base a les dades generades en els capítols anteriors del treball on s'han desenvolupat i estudiat cadascun dels sistemes de cultiu, i la resta d'equipaments del bioprocés es dimensionaran de forma coherent en relació a l'equip principal de producció. No obstant, el bioreactor s'ha de sobredimensionar d'acord amb les pèrdues de producte durant el procés de purificació, per tal de que el corrent de sortida de la planta sigui coherent amb la quantitat de producte que es vol obtenir. Finalment, al volum del reactor se li aplica un factor de seguretat que es quantifica en un sobredimensionament del 10%, per tal d'assegurar que s'assoleix la quantitat de producte per cycle desitjat.

La problemàtica en fixar el factor de recuperació de producte en el procés de purificació recau en que per a cada tipus de proteïna o producte a purificar els factors de recuperació són variables (Deutscher-1990). Tanmateix, s'utilitza un mètode per a quantificar el factor de purificació, que es basa en el factor associat a cadascun dels passos de purificació, i el productori de tots els factors de recuperació individuals correspondrà al factor global de recuperació de la planta. Tenint en compte, que el producte es destina a la profilaxi en el sector veterinari, donat que no és necessari un grau de purificació exhaustiu, els circuits de purificació són relativament senzills. A la Taula 9-1 es mostren els factors de recuperació associats a cadascuna de les etapes individuals de purificació (Harrison *i col.* 2000).

Etapa	Factor de recuperació	
Centrifugació	0,98	
Homogeneïtzació	0,98	
Filtració	Proteïna	0,95
	Virus	0,92
Gel filtració	0,95	

---

Taula 9-1: Recull dels diferents factors individuals de recuperació per a les diferents etapes que es proposen en els diferents sistemes de purificació.

---

El nombre de processos que es podran realitzar per any es defineix a partir de la base de càlcul d'operació de la planta que es fixa en 7920 hores ó 330 dies a l'any, i els colls d'ampolla es situen en l'equip central de cultiu, el bioreactor.

A partir de la dada d'objectiu de producció, per cada un dels bioprocessos es poden realitzar els primers càlculs per a quantificar les variables de disseny, a partir dels paràmetres calculats en els capítols anteriors per cada un dels sistemes productius estudiats.

### **9.2.1. Sistema productiu de la vacuna clàssica IBDV-Cèl·lules**

#### **Vero.**

La definició de la quantitat de producte a obtenir es defineix a partir del nombre de dosis anuals i de la quantitat de virus necessària per a conformar una dosi. S'assumeix que la vacuna clàssica que es confecciona a partir de virus atenuats, mitjançant la via química per addició de formol. La dosi vacunal per un virus atenuat és de  $10^6$  unitats víriques, el que implica una producció anual de  $5,0 \cdot 10^{14}$  partícules víriques, per a assolir la producció fixada en aquesta simulació,  $5 \cdot 10^8$  dosis/any.

Per a realitzar la simulació de la planta productiva es prenen els valors que s'han extret del darrer experiment del primer capítol dels Resultats i discussió, concretament de l'apartat 4.5.1. Consisteix en un cultiu en discontinu amb una concentració de 3 g/L de Cytodex 3 (V/S=0,12) que ha estat infectat amb una MOI de 5 virus/cèl·lula. La concentració vírica final



que s'assoleix al final del cultiu és de  $2,14 \cdot 10^{10}$  partícules/L, i la concentració de virus a l'inici de la infecció és de l'ordre de  $10^6$  partícules/L. El conjunt de dades per aquest procés es recullen a la Taula 9-2.

<b>IBDV- Cèl·lules Vero</b>	
Nombre de dosis/any	$5,00 \cdot 10^8$
Partícules víriques/dosi	$1,00 \cdot 10^6$
virus total anual	$5,0 \cdot 10^{14}$
% recuperació purificació	90
virus total anual al reactor	$5,6 \cdot 10^{14}$
Estratègia de cultiu	Discontinuu infectat
Medi de cultiu	MEMG + cytodex 3+10% FBS
Cost medi cultiu (€/Litre)	21
Temps del cultiu (h)	216
Temps preparació bioreactor (h)	24
Temps cicle productiu (h)	240
Nombre de cicles/any	33
Concentració vírica (PI/L)	$2,14 \cdot 10^{10}$
Volum total anual (L)	$2,6 \cdot 10^4$
Volum reactor teòric (L)	787
Volum reactor dissenyat (L)	850
Partícules virals/cicle	$1,8 \cdot 10^{13}$
Partícules virals/any	$6,0 \cdot 10^{14}$

Taula 9-2: Recull de paràmetres i càlculs inicials realitzats a partir de les dades experimentals per a l'anàlisi de la planta de producció de la vacuna clàssica mitjançant IBDV-Vero.

El rendiment global de recuperació del producte és del 90%, tot i que bibliogràficament es troben valors entre 40-60% (Li *i col.* 2004), aquests corresponen a valors de partícules infectives, i no partícules víriques totals, i són bàsicament deguts a la deterioració dels virus en l'etapa de filtració. El producte desitjat és una vacuna atenuada, per tant l'interès es centra en obtenir partícules víriques totals.

Finalment, el volum del reactor calculat, tenint en compte que la durada d'un cicle productiu és de 240 hores (temps del cultiu principal més 24 hores de posada a punt del mateix entre cicles), és de 787 litres, que es sobredimensiona fins a 850 litres de treball (els volums de reactor es sobredimensionen aproximadament en un 10%). Aquests valors impliquen un nombre total de 33 cicles anuals de producció.

## 9.2.2. Sistema d'expressió Baculovirus-Sf9.

En el cas de la VP2 expressada en *baculovirus* recombinant es disposen de dades de resposta immunològica obtingudes directament en aus, que han permès determinar que la dosi vacunal efectiva és de 3 µg de VP2. A partir d'aquesta dada i de la quantitat de dosis a produir anualment es possible calcular la quantitat anual a produir de VP2, que es corregeix amb el percentatge global de recuperació en la fase de purificació, valorat en un 85%, coincidint amb valors trobats en altres estudis que empen el mateix sistema d'expressió (Benavides *i col.* 2006). D'aquesta manera la quantitat de proteïna total a produir en un any a la sortida del reactor, sense tenir en compte la purificació és de 1,765 Kg/any, com es mostra en la Taula 9-3.

El cas que es pren com a base pel disseny de la planta és el cultiu discontinu infectat (apartat 5.5.1.3), en el qual s'assoleix una concentració cel·lular de  $3,5 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL, que segons dades d'altres treballs de cultius en cèl·lules animals correspon una massa total de 1 mg/mL (Paredes 1998), i una concentració final de VP2 de 42 µg/mL.

<b>Sf9-baculovirus</b>	
Nombre de dosis/any	$5,00 \cdot 10^8$
µgram Vp2/dosi	3
Kg VP2 total anual	1,5
% recuperació purificació	85
Kg VP2 total anual al reactor	1,765
Estratègia de cultiu	Discontinuu infectat
Medi de cultiu	IPL-41 supl + 5% FBS
Cost medi cultiu (€/Litre)	30
Temps del cultiu (h)	140
Temps preparació bioreactor (h)	24
Temps cicle productiu (h)	164
Nombre de cicles/any	48
Concentració cel·lular (g/L)	1
Concentració VP2 (µg/mL)	42
Volum total anual (L)	$4,20 \cdot 10^4$
Volum reactor (L)	875
Volum reactor dissenyat (L)	950
Producte total per cicle (g)	32,93
Producte total anual (Kg)	1,63

Taula 9-3: Recull de paràmetres i càlculs inicials realitzats a partir de les dades experimentals per a l'anàlisi de la planta de producció de la vacuna recombinant mitjançant *baculovirus-Sf9*.

El temps de durada del cultiu és de 140 hores, al que se li ha d'afegir 24 hores necessàries per a la neteja i posta a punt de nou del bioreactor, obtenint-se una durada de cicle productiu de 164 hores, podent-se efectuar 48 cicles productius per any. A partir de tots els paràmetres i dades exposats i recollits en la taula, es pot calcular un volum de reactor de 950 litres, a partir del qual ja es pot definir la conformació de la planta.

### **9.2.3. Sistemes d'expressió *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*.**

En el cas de l'expressió en *Escherichia coli* o en *Pichia pastoris*, s'han d'assumir diferents paràmetres en base a la informació bibliogràfica, ja que en aquests organismes o bé s'ha expressat una proteïna de fusió de la qual no se sap la capacitat de transferir protecció immunològica o no ha estat possible expressar el candidat vacunal, en el treball actual.

En la bibliografia consultada es quantifica la dosi vacunal de la proteïna VP2 expressada en *E. coli* en 50 µg per la VP2 purificada i 150 µg d'extracte sense purificar (Omar *i col.*·2006). Aquests resultats indiquen possiblement, propietats de protecció immunològica inferior a la VP2 expressada en *baculovirus*. Així doncs, s'assumeix com a dosi vacunal 50 µg de VP2-DHFR, el que suposa un increment de la proteïna a produir de més de 15 vegades respecte la dosi de VP2 en el sistema de *baculovirus*. Certament, aquest és un criteri conservatiu, que en tot cas, s'hauria de modificar quan s'assolís l'expressió del candidat vacunal en *E.coli*.

Per altra banda, a partir de la quantificació de la quantitat de VP2-DHFR produïda a partir dels gels de proteïnes i l'anàlisi per tècniques immunològiques (apartat 6.3.1.2), es pot fixar el rendiment de proteïna soluble respecte a la concentració cel·lular d'*E.coli* (en pes sec) en un valor de 0,0187 g VP2-DHFR/g PS. Com s'ha comentat amb anterioritat aquest valor és baix, degut a l'efecte sobre el creixement per part del gen o de la pròpia proteïna, si es compara amb altres valors com en la producció d'insulina que pot arribar fins a un 20% del pes sec de les cèl·lules, tot i que es tracti de cossos d'inclusió (Harrison *i col.*·2000). Altres autors situen el nivell d'expressió d'un bon sistema recombinant en un 10% del pes sec de les cèl·lules (Kramer *i col.*·1996). La resta de dades provenen de la fermentació en discontinu alimentat que ha estat induït amb una concentració de IPTG de 0,03 mMols/g PS, dades que es recullen a la Taula 9-4.

Finalment, pel cas de l'expressió en *Pichia pastoris*, tenint en compte que no ha estat possible assolir l'expressió de VP2 en aquest sistema, es proposa establir una determinada base de càlcul, que permeti efectuar la seva anàlisi, tot i que evidentment els resultats que se'n puguin extreure resten supeditats a poder aconseguir l'expressió en els nivells assumits per aproximació.

El criteri escollit es basa en l'evidència experimental que s'ha pogut aconseguir en l'expressió de la  $\beta$ -galactosidasa. Tanmateix, si es pren com a referència la relació de concentracions de  $\beta$ -galactosidasa obtingudes en els sistemes d'*E.coli* i *P.pastoris*, i s'extrapolen les dades anteriorment calculades pel sistema d'*E.coli* a *P.pastoris*, a nivell de dosi vacunal, és possible plantejar un escenari de producció en *P.pastoris*, i realitzar els càlculs d'anàlisi del bioprocés. Per tant, tenint en compte que en aquest treball s'han aconseguit expressions de  $\beta$ -galactosidasa en *P.pastoris* dues vegades superiors respecte *E.coli*, es planteja fixar una base de càlcul de treball de 0,036 g VP2-DHFR/g PS, conservant la proporció de dues vegades d'increment. Si es compara amb altres treballs, també resulta un valor situat en el rang baix d'expressió de proteïnes recombinants en el sistema de *P.pastoris*, ja que sota del promotor AOX s'aconsegueixen nivells d'expressió del 30% de la proteïna soluble de la cèl·lula, assumint que el 50% de la cèl·lula correspon a proteïna soluble, significa un valor de 0,15 g producte/g PS (Cregg *i col.*·1987). Altres autors corroboren aquests nivells d'expressió, com per exemple la expressió intracel·lular d'un fragment de la toxina del tètanus que s'assoleix un 27% de la proteïna soluble, el que significaria uns 0,135 g VP2-DHFR/g PS (Clare *i col.*·1991).

En ambdós casos, l'estratègia de cultiu que s'ha definit com la més productiva és la discontinua alimentada, i els volums de reactor necessaris per a fer front a la producció de la VP2 necessària, tenint en compte el temps de cada un dels cicles productius, així com el rendiment de recuperació del procés de purificació (del 80% en els dos casos, ja que el procés de purificació és idèntic), i la concentració cel·lular que s'assoleix en cada un dels casos, són de 240 litres per *E.coli* i 145 litres per *P.pastoris*. Segons valors bibliogràfics, els percentatges de recuperació per *Pichia pastoris* poden arribar a ser del 90% (Jahic *i col.*·2006), i del 80% en *E.coli* (Lueking *i col.*·2000). El valor del factor de recuperació obtingut és coherent amb el que s'ha obtingut amb el sistema de baculovirus-*Sf9*, ja que tractant-se de processos de purificació similars, i degut a la major dificultat de disrupció dels llevats i bacteris envers a les cèl·lules d'insecte, tot i augmentar a dos cicles de homogeneïtzació, el rendiment és un 5% inferior respecte el cas de cèl·lules d'insecte.

	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>
Nombre de dosis/any		$5,00 \cdot 10^8$
µgram Vp2/dosi	50	50
Kg VP2 total anual	25,0	25,0
% recuperació purificació	80	80
Kg VP2 total anual al reactor	31,250	31,250
Estratègia de cultiu	FB	FB
Medi de cultiu	MD	FBMS
Cost medi cultiu discontinu (€/Litre)	0,7	1,2
Cost medi addició (€/Litre)	1,5	1,6
Temps del cultiu (h)	35	95
Temps preparació bioreactor (h)	24	24
Temps cicle productiu (h)	59	119
Nombre de cicles/any	134	66
Concentració cel·lular (g PS/L)	60	100
Rendiment (gVP2/g PS)	0,018	0,036
Volum total anual (L)	$2,89 \cdot 10^4$	$8,68 \cdot 10^3$
Volum reactor (L)	251	131
Volum reactor dissenyat (L)	240	145
Producte total per cicle (g)	207,36	417,6
Producte total anual (Kg)	27,79	27,56

Taula 9-4: Recull de paràmetres i càlculs inicials realitzats a partir de les dades experimentals per a l'anàlisi de la planta de producció de la vacuna recombinant mitjançant *E.coli* i *P.pastoris* recombinants.

### **9.3. Descripció dels bioprocessos.**

Definides les principals variables de disseny dels bioprocessos a comparar, centrades bàsicament en l'etapa del cultiu, el següent pas consisteix en elaborar el diagrama de procés en el que han de constar tots els equips principals que conformen el procés. L'equip principal de la planta és el bioreactor, i el diagrama de procés es pot dividir en dues parts diferenciades: la primera la conforma el bioreactor i tots els equips que permeten que es desenvolupi el cultiu a l'escala final de producció, i la segona és la part posterior al bioreactor, on s'ubiquen tots els equips en els que es duen a terme totes les diferents operacions que conformen el procés de purificació. S'han de dimensionar també tots els equips, definir els serveis necessaris, els requeriments energètics i les matèries primeres que s'han d'emprar. Alguns d'aquests termes els calcula directament el programari de simulació i altres es fixen per l'usuari.

### 9.3.1. Diagrama de procés basat en el sistema IBDV-Cèl·lules

#### Vero.

Aquest primer procediment necessita d'un conjunt d'equips força nombrós degut a la limitació que presenten els cultius de cèl·lules superfície dependents, ja que no permeten assolir densitats cel·lulars elevades. En aquest cas concret, aquest fet està agreujat per la baixa replicació vírica, necessitant un volum d'inòcul víric en el moment d'infecció elevat. Aquest fet es veu reflexat en el diagrama que mostra la Figura 9-1, on a l'esquerra del bioreactor principal (V-101) de 850 L de volum, hi ha els dos circuits de producció dels inòculs. Els dos circuits són bàsicament iguals: s'inicia el canvi d'escala amb una sèrie de 8 ampolles rodants (RBR-101 i RBR-102) que, un cop crescudes, serveixen d'inòcul als primers bioreactors de 8 litres de volum on les cèl·lules creixen sobre microsuports (V-105 i V-102). Per a desancorar les cèl·lules dels microsuports s'extreu el medi de cultiu i s'addiciona una solució hipotònica (en base de clorur sòdic, clorur potàssic i glucosa) amb una relació de 50 ml de solució per gram de Cytodex 3 (Lai *i col.*·1980). S'extreu el sobrenedant parant l'agitació i deixant sedimentar les cèl·lules i microsuports i a continuació s'inocula el següent bioreactor de 80 litres de volum (V-106 i V-104) (GEHealthcare·2005). En aquest bioreactor rau la principal diferència dels dos circuits canvi d'escala. Mentre que l'operació es repeteix per a obtenir la quantitat de cèl·lules necessàries per a inocular el bioreactor principal des del bioreactor d'augment d'escala (V-104), el bioreactor on es produeix l'inòcul víric (V-106) s'hi produeix l'etapa d'infecció. Aquests dos bioreactors es transvasen al bioreactor principal de forma seqüencial. Per a recuperar les cèl·lules que han de conformar l'inòcul del bioreactor V-104, d'un volum considerable, se separen les cèl·lules dels microsuports amb l'addició de la solució hipotònica, i amb una centrifugació per gradient de densitat, que permet obtenir separatament els microsuports, les cèl·lules i la solució hipotònica (Manousos *i col.*·1980) (BC-10). El medi de cultiu s'elabora en el circuit situat a la part superior dreta, solubilitzant el medi en pols (V-103), i posteriorment es filtra i s'hi addiciona el sèrum de forma estèril (S-113).

Una vegada acabat el cultiu, que comptabilitzant el creixement cel·lular i l'etapa d'infecció té una durada de 216 hores, s'inicia la fase de purificació. El sobrenedant (on hi ha els virus) es transvasa a un tanc (V-107) on es procedeix a la inactivació vírica per a manufacturar la vacuna. La inactivació vírica es realitza per via química, mitjançant l'addició de formol al sobrenedant, i deixant la mescla durant 24 hores a 37°C.

Finalment, els últims passos que manquen per a obtenir el corrent de producte consisteixen en dues etapes de purificació que garanteixin que no hi ha sòlids ni restes

cel·lulars en el corrent de sortida. Primer es realitza una centrifugació (DS-101) i finalment, una filtració a 0,22 µm (DE-102).

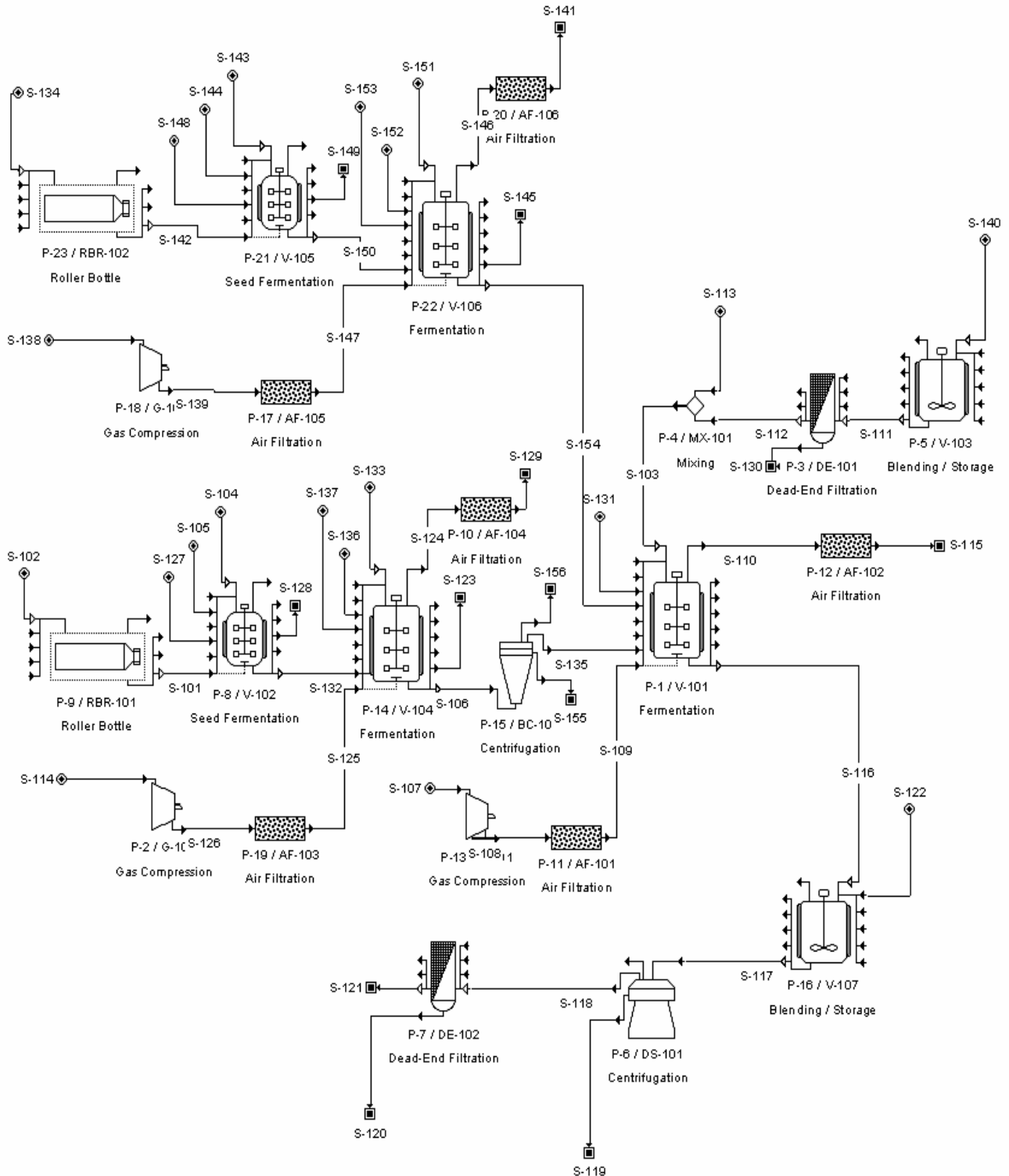


Figura 9-1: Diagrama de procés proposat per a la producció de la vacuna clàssica en el sistema IBDV-Cèl·lules Vero. El diagrama consta de tres parts principals. A la part superior esquerra es situa el conjunt d'equips per a l'elaboració d'inòcul víric. A la part central hi ha el tren principal d'equips de producció de la vacuna clàssica. I finalment a la part dreta i inferior del diagrama els equips de purificació.

### 9.3.2. **Diagrama de procés basat en el sistema baculovirus-Sf9.**

El bioprocés que es mostra en la Figura 9-2, s'inicia en la producció del inòcul cel·lular, que degut a les dimensions del bioreactor (V-101) de 950 litres de volum, es desenvolupa en dues etapes on s'utilitzen bosses de cultiu d'un sol ús, la primera de 10 litres (BBS-102), que es transvasa quan s'assoleix una densitat cel·lular de  $3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL a la segona (BBS-103) de 90 litres, i posteriorment s'inocula el bioreactor de cultiu.

Per una altra banda, el inòcul víric s'elabora en un altre bioreactor de bossa de 10 litres de volum (BBS-101). Així doncs, els passos d'increment d'escala per les cèl·lules mantenen una relació d'un factor de dilució de 10, de manera que es garanteixi realitzar la inoculació del bioreactor a una densitat cel·lular suficient a partir d'un cultiu que estigui en fase de creixement exponencial. En canvi, per l'elaboració del inòcul víric és suficient mantenint un factor de dilució de 100.

El medi de cultiu (IPL-41 amb suplementes) necessari per a desenvolupar el bioprocés es prepara en un tanc agitat (V-102), i abans de ser introduït en el bioreactor es filtra i s'hi afegeix estèrilment el sèrum necessari (fins al 5% de FBS). Finalment el bioreactor està equipat amb un sistema d'aeració compostat per un compressor (G-102) i dos filtres, un a l'entrada (AF-104) i l'altre a la sortida de gasos del bioreactor (AF-102).

Una vegada s'ha desenvolupat el procés productiu, el brou es transvasa a un tanc d'emmagatzematge (V-104) on s'iniciarà la purificació, mentre el bioreactor es neteja i es prepara pel nou cicle. La purificació s'inicia recuperant les cèl·lules mitjançant una centrifugació, i posteriorment la massa cel·lular es lisa amb tampó bicarbonat (25 mM en el tanc V-103 en una proporció de 1 ml de tampó per cada  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules). A continuació, i per a garantir la total lisi de les cèl·lules, es procedeix a un cicle d'homogeneïtzació (HG-101), i es procedeix a separar les restes cel·lulars del producte soluble amb una nova centrifugació (DS-102) i una filtració (DE-102) per a garantir l'absoluta manca de partícules sòlides en l'entrada de la columna de gelfiltració (C-101) on finalment s'obté el corrent purificat de VP2 en el corrent S-123.



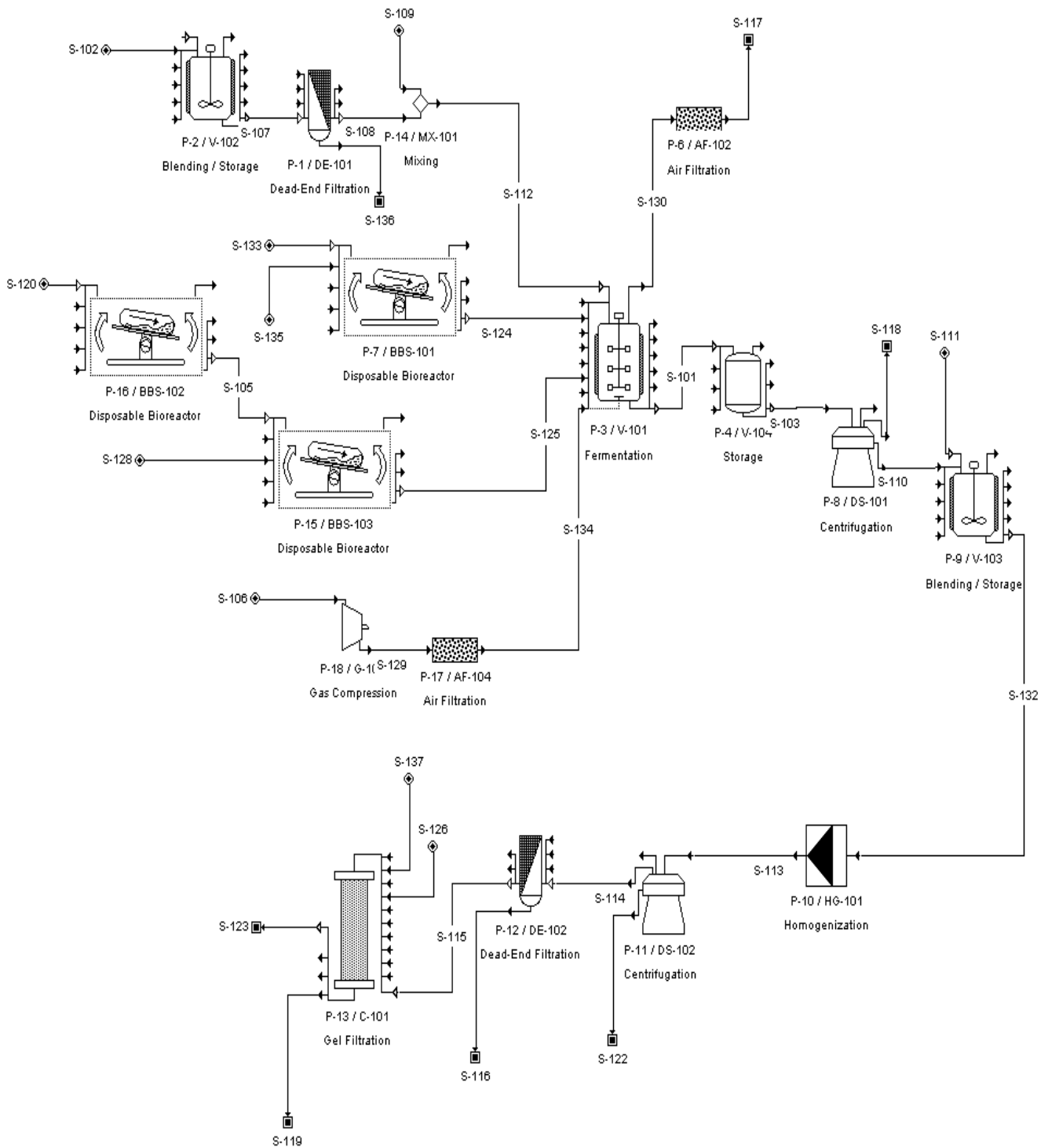


Figura 9-2: Diagrama de procés proposat per a la producció de la vacuna recombinant (VP2) en el sistema *baculovirus-Sf9*. El diagrama consta de tres parts: el circuit superior d'equips està destinat a l'elaboració del medi de cultiu. La part central consisteix en el conjunt d'equips proposats per a realitzar l'inòcul cel·lular i víric necessari pel bioreactor de producció. Finalment el conjunt d'equips de la part inferior del diagrama es destina a la purificació de la proteïna.

### **9.3.3. Diagrama de procés pel sistema basat en la producció de VP2 en *E.coli*.**

Les majors diferències en aquest cas respecte els diagrames proposats pels sistemes que usen cèl·lules d'animals es centren en la zona de cultiu, en la preparació de l'inòcul, i dels medis necessaris per a desenvolupar l'estratègia del bioprocés. Com es pot observar l'elaboració de l'inòcul es realitza en un bioreactor de 15 litres de volum (V-106), amb el que es pot inocular directament el bioreactor de 240 litres (V-101), degut a que el factor de dilució en cultius bacterians per a la inoculació pot ser fins i tot superior a 20, a causa de la facilitat de generació de cèl·lules en aquest tipus de sistemes. El reactor de producció disposa d'aeració a partir d'un compressor (G-101) que impulsa aire enriquit amb oxigen al 10% (considerant un valor mitjà al llarg de tot el cultiu), a causa de la major demanda d'oxigen en els cultius bacterians d'alta densitat. El corrent de gas és filtrat abans i després de bioreactor, per assegurar l'esterilitat i l'estanqueïtat del sistema.

L'altra diferència del diagrama es centra en que per l'estratègia de cultiu escollida per *E.coli* s'han d'elaborar dos medis de cultiu diferents, el medi MD per a l'etapa discontinua (V-102) de creixement cel·lular i el medi d'addició per a l'etapa discontinua alimentada (V-105). Els medis s'esterilitzen per calor (ST-101 i ST-102). En el cas del medi d'addició per a l'etapa discontinua alimentada, inicialment, s'empra el medi ric en glucosa per tal d'assolir altes densitats cel·lulars, fins arribar a la concentració cel·lular de 60 gPS/L, moment en que s'afegeix al corrent d'addició l'inductor de l'expressió del bacteri, l'IPTG estèril ja que és recomanable no esterilitzar l'IPTG per calor. La concentració de treball de l'inductor correspon a 0,03 mmols IPTG/g PS, que s'ha de mantenir constant al llarg de tota la inducció.

El temps d'un cicle productiu és de 59 hores, el que significa que es poden realitzar 134 cicles productius anuals. La dimensió dels equips principals s'ha realitzat en funció de la Taula 9-4

Com es pot observar en la Figura 9-3, el procés de purificació que es dissenya és similar al del bioprocés emprat en el sistema *baculovirus-Sf9*, i es mantindrà pel bioprocés basat en *Pichia pastoris*. La principal diferència recau en que es realitzen dos cicles d'homogeneïtzació degut a la major resistència d'aquest tipus de microorganismes a la disrupció i en la dimensió de la columna, degut a la major quantitat de proteïna que s'ha a purificar.

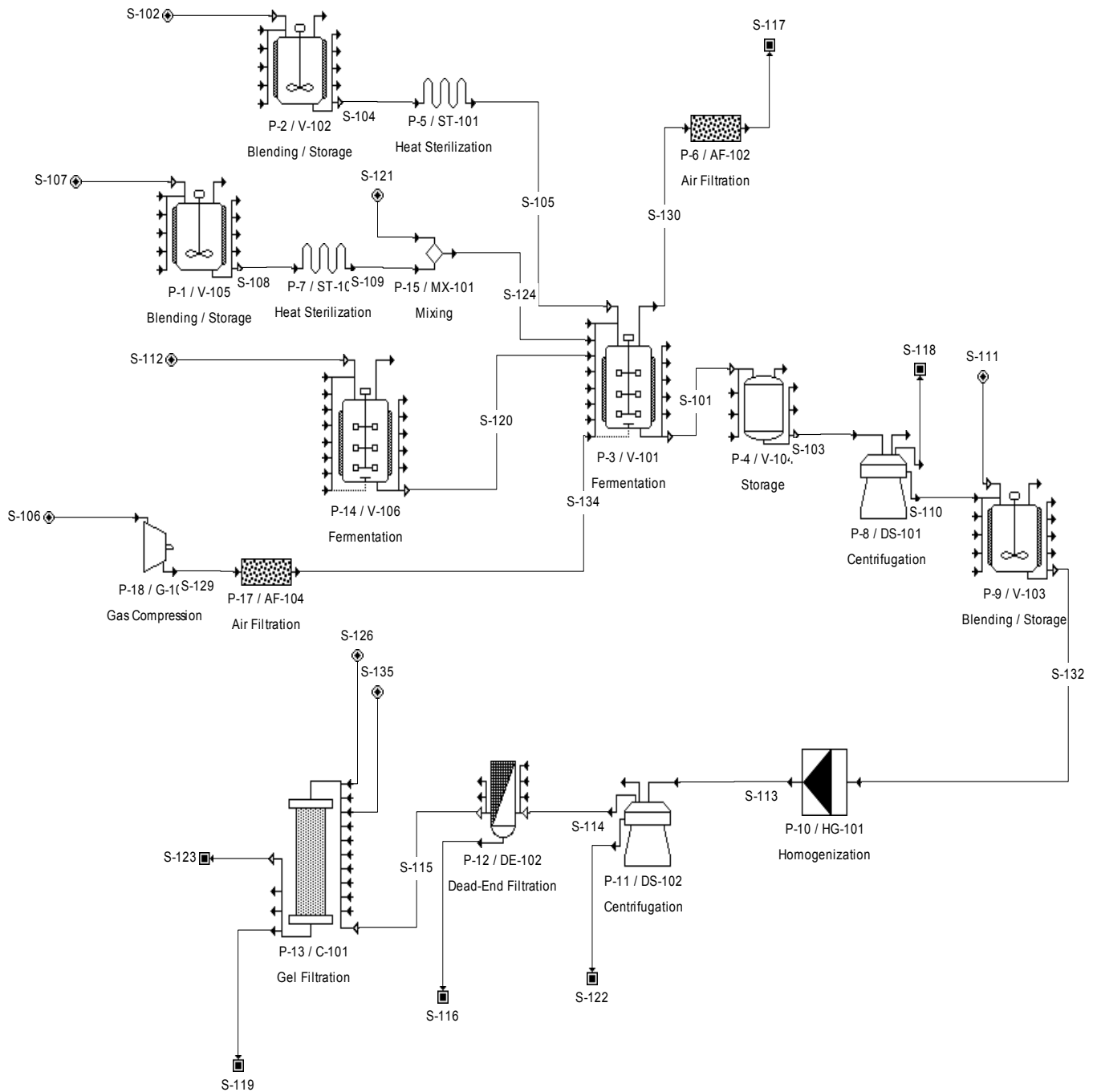


Figura 9-3: Diagrama de procés proposat per a la producció de la vacuna recombinant (VP2) en el sistema *E.coli* recombinant. El diagrama consta de quatre parts: el circuit superior d'equips està destinat a l'elaboració del medi de cultiu per a l'etapa discontinua, i el circuit inferior situat a continuació és el d'elaboració del medi d'addició. La part central consisteix en el conjunt d'equips proposats per a realitzar l'inòcul necessari pel bioreactor de producció. Finalment el conjunt d'equips de la part inferior del diagrama es destina a la purificació de la proteïna VP2.

### **9.3.4. Diagrama de procés pel sistema basat en la producció de VP2 en *P.pastoris*.**

El darrer bioprocés que es dissenya és pel sistema de *P. Pastoris*, que és bàsicament el mateix que s'ha emprat pel cas d'*E.coli*, però amb la diferència deguda al sistema d'inducció que empra aquest llevat metilotròfic, que es realitza amb un medi ric en metanol.

Les dimensions dels equips principals, com la del bioreactor principal és de 145 litres (V-101), inoculat a partir del bioreactor de canvi d'escala V-106 de 10 litres. Degut a la cinètica més lenta de la *P.pastoris* en front del sistema bacterià, el temps necessari per a realitzar un cicle productiu és de 119 hores, el que suposa poder realitzar 66 cicles anuals. De manera semblant a al cas d'*E.coli*, hi ha dues etapes en aquest tipus de bioprocés en que s'usa una estratègia discontinua alimentada, i per tant dos circuits de preparació de medi. En el primer situat a la part superior (V-102) s'elabora el medi FBSM per a l'etapa discontinua, i en el moment en que s'esgota el glicerol es procedeix a l'etapa d'adaptació del canvi de font de carboni (a metanol) per a realitzar la inducció. L'addició del medi ric en metanol es basa en l'estratègia de  $pO_2$ -stat, amb un valor de consigna del 35% de  $pO_2$ . El medi que s'utilitza per a la inducció en base a metanol (M-FB-2) s'elabora en el tanc (V-105), i degut a les seves característiques s'ha d'esterilitzar per filtració. L'etapa d'adaptació al canvi de la font de carboni es realitza en el moment en que el cultiu assoleix una densitat cel·lular de 30 gPS/L. Al final del cultiu la concentració cel·lular generada és de 100 gPS/L.

El reactor de producció disposa d'aeració a partir d'un compressor (G-101) que impulsa aire enriquit amb oxigen al 10% (considerant un valor mitjà al llarg de tot el cultiu), a causa de la major demanda d'oxigen en els cultius de llevats d'alta densitat. El corrent de gas és filtrat abans i després de bioreactor, per assegurar l'esterilitat i l'estanqueïtat del sistema.

Respecte el sistema de purificació, compostat pel conjunt d'equips de la zona dreta i inferior del diagrama de procés, és idèntic al que s'ha proposat pel sistema anterior basat en el cultiu de *E.coli*.

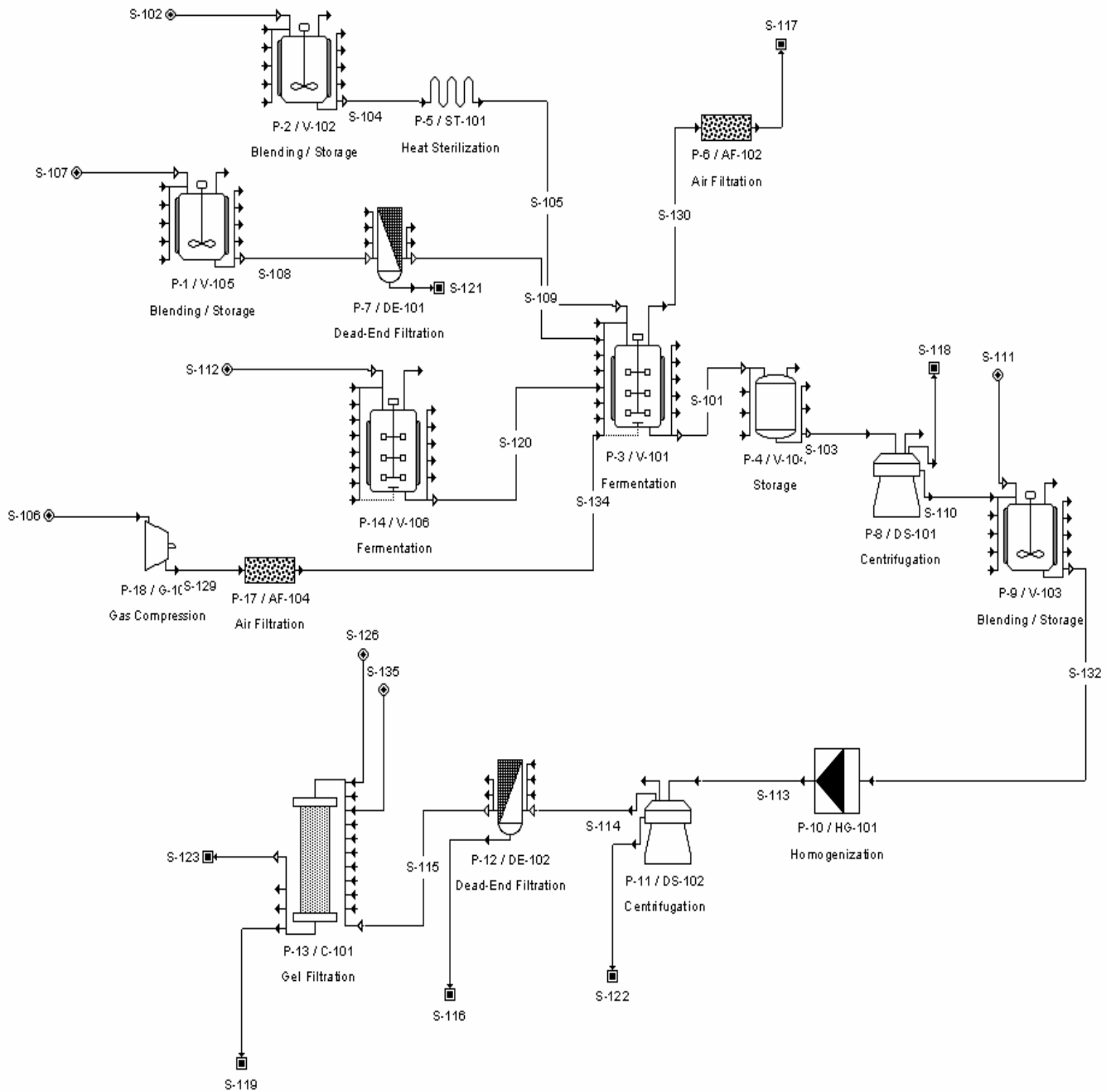


Figura 9-4: Diagrama de procés proposat per a la producció de la vacuna recombinant (VP2) en el sistema *P.pastoris* recombinant. El diagrama consta de quatre parts: el circuit superior d'equips està destinat a l'elaboració del medi de cultiu per a l'etapa discontinua, i el circuit inferior situat a continuació és el d'elaboració del medi d'addició. La part central consisteix en el conjunt d'equips proposats per a realitzar l'inòcul necessari pel bioreactor de producció. Finalment, el conjunt d'equips de la part inferior del diagrama es destina a la purificació de la proteïna VP2.

## **9.4. Avaluació econòmica.**

Una vegada han estat definits els diferents bioprocessos, s'han dimensionat els equips i quantificat el volum de reactius necessaris a partir dels balanços de matèria aplicats a les plantes amb l'ajuda del programari SuperPro Designer, es pot procedir a realitzar l'avaluació econòmica de cadascuna de les propostes presentades. Als annexes es poden trobar les taules resum dels preus dels equips, el cost de les matèries primeres, del material fungible, el cost dels salaris dels treballadors, etc., que han estat emprades per a realitzar els càlculs de les plantes industrials.

### **9.4.1. Inversió total del projecte.**

La inversió total del projecte es divideix en dues partides diferenciades, que són el capital immobilitzat i el capital circulat. La primera partida contempla els costos associats a la construcció de la planta, i la segona a aspectes puntuals per a poder fer que la planta estigui operativa. El capital circulat contempla els costos d'arrendada, el capital de treball i els costos de I+D+I. A continuació és detalla com s'ha realitzat el càlcul dels diferents costos.

#### **Capital immobilitzat.**

El capital fix directe correspon als costos que es deriven directament de la construcció de la planta productiva, el que també s'anomena costos físics. El capital fix directe es divideix en costos directes, els costos indirectes i altres costos.

---

#### **A. COSTOS TOTAIS DIRECTES (CTD)**

a. Cost dels equips (CE)	Suma de costos individuals
b. Instal·lació	Suma de costos individuals
c. Conduccions i connexions	0,35·CE
d. Instrumentació	0,40·CE
e. Aïllament	0,03·CE
f. Sistemes elèctrics	0,35·CE
g. Construccions	0,45·CE
h. Acondicionament terreny	0,15·CE
i. Serveis auxiliars	0,40·CE

---

<b>B. COSTOS TOTALS INDIRECTES (CTI)</b>	
a. Enginyeria	0,25·CTD
b. Construcció	0,35·CTD
<b>C. ALTRES COSTOS (AC)</b>	
a. Taxes del contractista	0,05·(CTD+CTI)
b. Imprevistos	0,10·(CTD+CTI)
<b>CAPITAL IMMOBILITZAT</b>	<b>CTD+CTI+AC</b>

Taula 9-5.: Components del capital immobilitzat en una planta, en funció dels coeficients establerts a partir dels criteris generalment acceptats.

### Costos totals directes (CTD).

La base de càlcul a partir de la qual es calcula cada una de les partides dels costos totals directes (a excepció del cost dels equips i d'instal·lació), es genera a partir de la suma del **cost dels equips** (recollits en la base de dades del programari), i del **cost d'instal·lació** (que depèn del tipus d'equip). Per a calcular la resta de partides dels costos directes, s'ha d'aplicar un seguit de coeficients generalment acceptats a la base de càlcul (M Peters i Timmerhaus 1991), com es mostra a la Taula 9-5.

Els costos dels equips es calculen a partir de valors per defecte que disposa de la base de dades del programari de simulació, i aquests es corregeixen segons la relació de les dimensions concretes, seguint una raó que les relaciona, com es mostra en la següent funció:

$$\text{Cost} = \text{Cost}_{\text{base}} \cdot \left( \frac{D}{D_{\text{base}}} \right)^a$$

On el  $\text{Cost}_{\text{base}}$  és el valor del cost de l'equip provinent de la base de dades disponible en el SuperPro, mentre que  $D_{\text{base}}$  és la dimensió característica (corresponent al cost base de la base de dades),  $D$  és la dimensió de l'equip concret dissenyat i  $a$  un coeficient de la relació (que està fixada per cada tipus d'equip en el mateix programari).

Els altres costos directes es defineixen de la següent manera:

**Conduccions i connexions:** cost associat a tot el sistema de canonades i conductes, així com totes les connexions necessàries.

**Instrumentació:** cost de tots els elements de control i instrumentació que permetin que la planta funcioni de manera adequada, així com els sistemes de seguretat i alarmes.

**Aïllament:** són els costos que es desprenen dels elements d'aïllament tèrmics, així com els de confinament.

**Sistemes elèctrics:** referits als costos de disposar d'un operatiu amb fonts d'energia alternatives i de seguretat que puguin aportar energia en cas de caiguda de la tensió de la xarxa. Inclou estabilitzadors de corrent per a la protecció d'equips, com Serveis d'Alimentació Ininterrompuda, i generadors elèctrics.

**Construccions:** consisteix en el cost de construcció de plataformes, sales de control sense equips, passarel·les, galeries de serveis, etc..

**Condicionament del terreny:** cost de la construcció dels accessos de la planta, el pàrquing del personal, ports de càrrega i descàrrega, zona verda, etc..

**Serveix auxiliars:** equips no descrits en la planta del procés, però que aporten els serveis auxiliars necessaris pel procés, com els vapor d'aigua de calefacció, sistemes de refrigeració, etc..

### **Costos totals indirectes (CTI).**

Els costos totals indirectes són aquells costos de la construcció de la planta que no estan associats a un equip, sigui principal, auxiliar, o a una zona de la planta, i es centren bàsicament en els costos d'**enginyeria** que inclouen el disseny de la planta, fulls d'especificacions dels equips, i en els costos de **construcció**. Els dos tipus de costos indirectes és calculen aplicant un coeficient al cost total directe.

### **Altres costos (AC)**

Els altres costos es defineixen com els costos que representa els guanys de l'empresa constructora (**taxes del constructor**) i també es destina una partida pressupostària als possibles imprevistos que puguin sorgir en el procés de construcció de la planta. Aquests



costos es calculen a partir d'aplicar uns coeficients als costos totals (CTD i CTI), que corresponen a un 5% per l'enginyeria i un 10% per a fer front als possibles imprevistos.

### **Capital circulant.**

El càlcul del capital circulant es centra bàsicament en dues partides anomenades el capital de treball i el cost d'arrencada. El **capital de treball** consisteix en els costos per a mantenir la planta en funcionament i es calcula en funció dels costos d'operació (mà d'obra, matèries primeres, serveis, ...), de manera que dota a la planta d'un marge de temps en que pugui continuar operant encara que sorgeixi algun contratemps. En el present cas, es valora el capital de treball en el cost d'operació de 30 dies, el que representa gairebé un 10% del total.

Per altra banda, el **cost d'arrencada** consisteix en la despesa que hi ha entre que la planta comença a funcionar i esdevé plenament productiva. Aquesta despesa es calcula juntament amb el cost de validació de la planta, i en el present cas es quantifica com un 5% del capital immobilitzat, valor acceptat en aquest tipus de plantes (Harrison *i col.*:2000)

L'últim cost que es considera dins l'apartat del capital circulant, és el **cost de I+D+I**, que correspon a la despesa que s'ha de realitzar per a mantenir el Departament de Investigació, Desenvolupament i Innovació, imprescindible per a poder desenvolupar bioprocessos que desemboquin a produccions industrials. Aquest cost en el present estudi es considera fix per a tots els casos estudiats i es valora en 200.000 euros.

### **Cost d'operació.**

Els costos d'operació són la suma de tots els costos associats al funcionament de la planta productiva per a l'obtenció del producte, i aquests costos són proporcionals a la quantitat de producte que s'obté.

Els costos d'operació inclouen el cost del personal que treballa a la planta, que es comptabilitza a partir de coeficients assignats a les operacions i equips, el cost de les matèries primeres, cost de material fungible o d'un sol ús, els cost dels serveis consumits (vapor, electricitat, aigua de refrigeració...), el cost de tractament dels residus generats, etc.. La totalitat d'aquests costos s'avaluen directament mitjançant el programari al que se li introdueix els preus de les matèries primeres i del material fungible (per complementar la base de dades

del 2007, corresponent a la versió 7.1), el sou dels treballadors per hora (calculat a partir de relacions d'hores de feina segons el tipus d'equip i d'operació).

El programari inclou en aquesta partida l'amortització (A) de la planta. 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 és situa entre els 10 i els 20 anys, no és aconsellable superar aquest termini. Aquesta es calcula sobre el total del capital immobilitzat (CI), i en aquest treball s'ha fixat el temps d'amortització en 15 anys amb una estimació d'amortització lineal. A més, es considera que el 90% de la inversió total s'afronta mitjançant un crèdit bancari, amb un interès fix del 7%, incloent també aquest cost en l'apartat de costos d'operació. El valor restant de la planta es pot calcular a partir de l'amortització efectuada, tal com mostren les següents equacions, sent  $f$  la fracció amortitzada en els anys anteriors:

$$A = \frac{CI}{\text{Període A}} = \frac{CI}{15}$$

$$\text{Valor planta} = \frac{CI \cdot (1 - f)}{\text{Període A}} = \frac{CI \cdot (1 - f)}{15}$$

Aquesta categoria de costos també podrien incloure els costos de les patents, els costos de publicitat i de vendes, el transport, etc., costos que no han estat considerats en les simulacions realitzades per les diferents plantes planificades, ja que d'una banda són difícils de valorar, i d'altra banda, els efectes comparatius entre els diferents processos que s'utilitzen es consideren que seran del mateix ordre, i per tant no afegiran diferències sensibles de cara a l'estudi que es realitza.

#### **9.4.2. Anàlisi de rendibilitat.**

L'anàlisi de rendibilitat és l'eina que permetrà avaluar si un bioprocés és viable o no des del punt de vista econòmic, confrontant les dades dels costos que genera el bioprocés amb les dades dels beneficis que aporta. Primer de tot cal quantificar els ingressos que genera la comercialització del producte, un cop fixat el preu de venda. En el cas d'estudi s'ha de

considerar que el preu de venda es defineix per dosi vacunal (i no està fixat per gram de producte). Degut a que la dosi vacunal varia segons el bioprocés, el preu per unitat màssica de producte també serà diferent. Així doncs, segons el bioprocés utilitzat per a la producció, el preu de venda es veurà afectat com es mostra en la Taula 9-6.

	Dosi vacunal	Preu dosi (€)	Vendes/ producte (€/g)
IBDV	10 <sup>6</sup> partícules víriques	1,2·10 <sup>-2</sup>	- N D -
<i>Baculovirus-Sf9</i>	3 (µg)	1,2·10 <sup>-2</sup>	4016
<i>P.pastoris</i> i <i>E. coli</i>	50 (µg)	1,2·10 <sup>-2</sup>	241

---

Taula 9-6: Relació entre la dosi vacunal, el preu de venda associat per a una dosi, i el preu de venda en per gram de producte, per a cadascuna de les alternatives dels sistemes de producció. (ND, No Determinat).

---

Una vegada s'ha calculat el total de vendes anuals, es pot calcular el guany brut anual restant a les vendes el cost d'operació, i continuació per a calcular els beneficis nets, s'han de descomptar els impostos, que es fixen en un 30%, com mostren les següents equacions:

$$\text{Guany Brut} = \text{Vendes Totals} - \text{Cost d'Operació}$$

$$\text{Beneficis Nets} = \text{Guany Brut} (1 - 0,3)$$

### **Paràmetres d'anàlisi de la rendibilitat.**

En el procés de l'anàlisi de la rendibilitat hi ha un seguit de paràmetres que permeten definir la viabilitat o no del projecte, així com poder comparar diferents propostes d'inversió i escollir a priori la que ha de suposar una major rendibilitat de la inversió que es vol afrontar. Aquests paràmetres són el marge brut (quin percentatge del total de les vendes són guanys bruts), el retorn de la inversió (quin percentatge representen els beneficis nets en front del total de la inversió) i el temps de retorn (corresponent als anys en que es pot fer front a la inversió total, considerant els beneficis nets). Les formules de càlcul d'aquests paràmetres es mostren en les següents equacions:

$$\text{Marge Brut} = \frac{\text{Guany Bruts}}{\text{Total ventes}} \cdot 100$$

$$\text{Retorn Inversió} = \frac{\text{Benefici Net}}{\text{Inversió Total}} \cdot 100$$

$$\text{Temps de Retorn (anys)} = \frac{\text{Total Inversió}}{\text{Benefici Net}}$$

Al comparar els diferents projectes que s'avaluïn, cada un d'aquests paràmetres dóna un idea diferent de la rendibilitat, com per exemple un major marge brut significa que el cost operatiu de la planta és més baix, per tant, els costos de producció directament lligats a la quantitat de producte generat són menors respecte les altres opcions. Per altra banda, el retorn de la inversió i el temps de retorn donen una idea del benefici que es genera respecte la inversió aportada. Un dels paràmetres més sensibles per a la inversió és la taxa interna de rendibilitat (TIR), que consisteix en la taxa de descompte que permet recuperar la inversió inicial, i que marca el límit en el qual una inversió comença a ser rendible. En altres paraules, la TIR és la taxa de retorn que iguala els fluxos d'entrada de la caixa, amb els desemborsaments, per tant, és la taxa de retorn que atorga un valor nul al valor actual net, és a dir, al balanç econòmic net a la caixa.

Segons el risc que s'hagi d'assumir en una inversió, la TIR acceptable varia substancialment, augmentant molt la TIR acceptable a mesura que augmenta el risc. En aquest tipus d'inversions (indústria biomèdica o biofarmacèutica) no és aconsellable inversions amb TIR inferiors al 50%, degut a que és una indústria d'alt 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'obtindrà en una planta més versàtil, on se'n produeixin d'altres, de forma que es puguin compartir una sèrie de costos (instal·lacions generals, comercialització, distribució, obra civil...).

### **9.4.3. Avaluació econòmica dels bioprocessos.**

De les simulacions corresponents de les plantes productives dels bioprocessos (els valors de les quals es troben en els annexes corresponents), s'avaluen les seves anàlisis econòmiques, que es recullen a la Taula 9-7.

El primer que crida l'atenció de la taula resum de les diferents dades econòmiques és que el capital d'inversió total (o la seva principal partida, el capital immobilitzat) és similar en els processos de producció de la proteïna VP2 recombinant, i augmenta notòriament en el cas de la producció de la vacuna clàssica de IBDV. Aquest fet és degut al major nombre d'equips que s'han hagut de dissenyar per a poder realitzar els processos d'augment d'escala per a poder inocular el reactor principal. Entre tots els sistemes que produeixen VP2 recombinant, les diferències són poques i són causades per les diferents dimensions dels equips.

	IBDV	VP2-baculovirus	VP2-E.coli	VP2-P.pastoris
Capital d'Inversió Total (milions €)	15,090	11,154	11,238	10,087
Capital Immobilitzat (milions €)	13,970	10,237	10,382	9,366
Cost d'Operació (milions €/any)	4,909	4,247	3,665	2,373
Total ventes (milions €/any)	6,040	6,001	6,011	6,004
Benefici Brut (milions €/any)	1,131	1,754	2,346	3,631
Benefici Net (milions €/any)	0,791	1,228	1,642	2,542
Marge Brut (%)	18,72	29,23	39,03	60,47
Retorn d'Inversió (%)	5,24	11,01	14,61	25,20
Temps de retorn (anys)	19,07	9,08	6,84	3,97
TIR (Taxa Interna Rendibilitat) (%)	9,92	24,30	42,73	83,67

Taula 9-7: Recull de les principals partides de costos, ventes, beneficis, així com el Marge Brut, Retorn d'Inversió, Temps de retorn i TIR per cada un dels bioprocessos estudiats basats en els quatre sistemes productius diferents.

Si es compara els sistemes de producció de proteïnes recombinants, el bioprocés que empra el sistema *baculovirus-Sf9* disposa d'uns equips de cultiu de major volum respecte el sistema bacterià i de llevats, però contràriament, els equips de purificació són menors degut a la menor quantitat de proteïna a produir. Per tant, la diferència de cost entre les plantes queda compensat pels tres sistemes que produeixen VP2 recombinant. En canvi, les majors diferències es troben en el cost d'operació (matèries primeres, material fungible, mà d'obra, etc.), però bàsicament es centren en el cost dels medis de cultiu i els volums que s'utilitzen. Més endavant s'analitza amb més profunditat la comparació dels costos d'operació entre els diferents sistemes.

Observant la taula dels resultats de l'avaluació econòmica es conclou ràpidament que de les propostes de plantes realitzades, la que ofereix una millor rendibilitat a la inversió és el cas de la producció emprant *P.pastoris*, que ofereix una taxa interna de rendibilitat (TIR) major, concretament del 83,67%, vers els valors que s'obtenen pels altres sistemes que disminueixen fins a valors de 42,73 % per a l'*E. coli*, 24,30 % pel *baculovirus* i de 9,92 % pel IBDV. Vist des d'un altre punt de vista, el temps de retorn pel sistema més favorable (*P.pastoris*) queda fixat en 3,97 anys, en canvi, el temps de retorn per les altres propostes són majors, concretament de menys a més temps són: de 6,84 anys per l' *E.coli*, 9,08 pel *baculovirus* i de 19,07 anys pel sistema IBDV-Vero. Aquesta variabilitat que es dona en la viabilitat de la inversió a realitzar, donat que la inversió total o el capital immobilitzat (exceptuant el cas de IBDV) així com els ingressos deguts a les vendes totals anuals del producte són similars, es causada per la diferència que hi ha entre el cost d'operació dels diferents sistemes, tal i com es pot observar a la Figura 9-5.

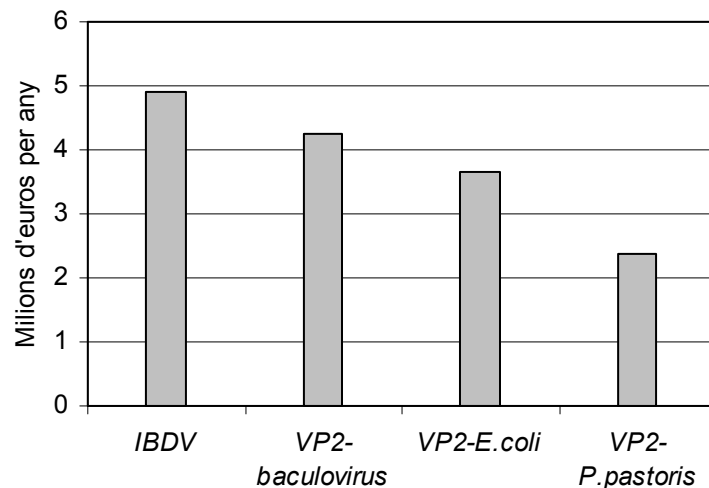


Figura 9-5: Comparació dels Costos d'operació de les diferents simulacions de les plantes realitzades pels sistemes productius dissenyats.

La relació dels costos d'operació entre el pitjor dels cassos (IBDV) i el millor (VP2-*P.pastoris*) és lleugerament superior al doble. És a dir, per a obtenir les mateixes vendes d'un producte destinat al mateix ús, costa el doble produir-lo en el sistema IBDV respecte el cost del sistema de *P.pastoris*. Si es compara el cost pels tres sistemes que produeixen VP2 recombinant, aquest augmenta de 2,37 milions d'euros l'any per a *P.pastoris*, a 3,67 milions pel cas de *E.coli*, 4,25 milions pel cas del *baculovirus-Sf9* i 4,909 milions pel cas de IBDV. Aquests augments en el cost d'operació repercuteixen en un menor quantia dels beneficis nets, i conseqüentment, una disminució de la viabilitat de la inversió, ja sigui justificada per la TIR o pel temps de retorn.

La Figura 9-6 mostra percentualment les aportacions de cadascuna de les partides que conformen el cost d'operació per a cada un dels sistemes.

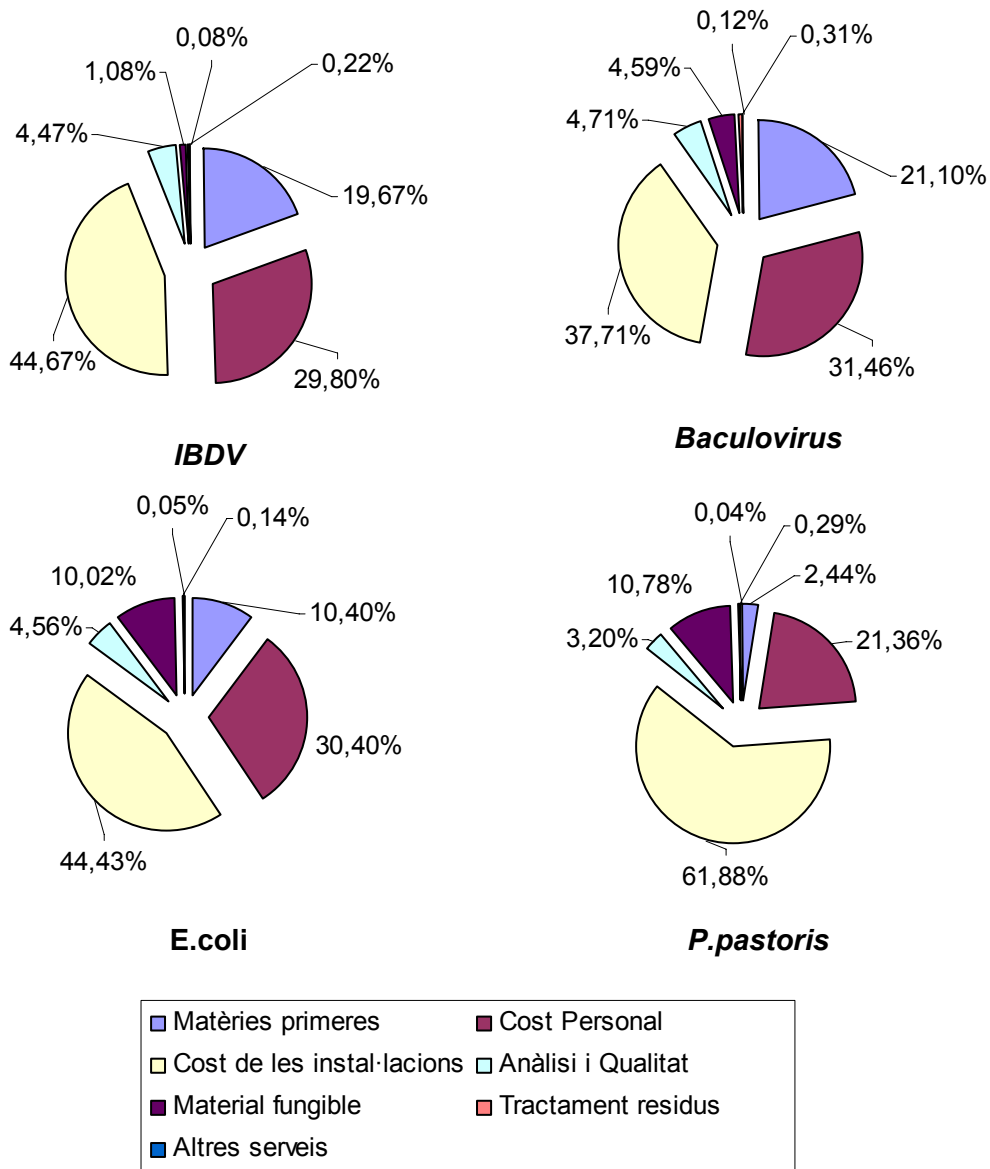


Figura 9-6: Diagrama de les aportacions percentuals de les diferents partides que conformen els costos d'operació per a cada un dels sistemes productius que han estat proposat. De dreta a esquerra i de dalt a baix corresponen a: IBDV-Vero, Baculovirus-Sf9, E.coli i P.pastoris.

Com es pot comprovar, el cost associat a les instal·lacions, que correspon a l'amortització del capital immobilitzat tenint en compte que s'hi ha comptabilitzat el cost dels interessos del préstec del 90% de la inversió total, correspon a la partida més gran de les que conformen els costos d'operació. Tenint en compte que el capital d'inversió total és similar en els sistemes de producció de proteïnes recombinants (al voltant de 1.500.000 €/any, exceptuant el cas de la producció en el sistema IBDV, que no es comparable directament degut al capital immobilitzat major respecte a la resta de sistemes, el qual suposa un valor de 2.200.000 €/any), a mesura que augmenta el percentatge que aquest representa en front a la

resta de partides, significa que la resta de partides són menors. Aquest fet posa de manifest que el cost de les partides més importants com les matèries primeres (bàsicament medis de cultiu), personal i material fungible incrementen, suposant un augment del cost d'operació, que finalment és el factor decisiu per a obtenir un procés més o menys rendible.

Concretament, si es compara per exemple l'aportació en el cost de les matèries primeres, és a dir, bàsicament dels medis de cultiu, aquest és quasi cinc vegades major pel sistema de *E.coli* (10,40%, 381.000 €/any) envers el sistema de *P.pastoris* (2,44%, 58.000 €/any), i aquest augment és molt més considerable en el cas del sistema de *baculovirus-Sf9*, que augmenta fins a un 21,1% suposant un total de 896.000 €/any. El motiu principal és degut a l'increment del preu dels medis de cultiu de cèl·lules animals, en front dels medis emprats pel cultiu de bacteris i llevats. Per una altra banda, la diferència entre el procés en bacteris o en llevats, recau en l'elevat preu de l'inductor (IPTG) dels cultius d'*E. coli*. Un altre motiu que contribueix a l'abaratiment del procés, és la disminució del volum de producció, que afecta directament al cost dels equips i de tots els costos relacionats directament (personal, serveis,...) i a la quantitat, i per tant, al cost de les matèries primeres. Com ja és sabut, una de les màximes per tal d'obtenir processos més rendibles, consisteix en disminuir el volum de producció, ja sigui causat per un canvi del sistema d'expressió o per a emparar estratègies de cultiu d'alta densitat cel·lular, que ofereixen processos molt més productius.

Una altra partida en la que s'observen diferències és la destinada al personal de la planta, que es calcula de forma automàtica pel programari emprat i és funció del tipus d'equipament i del tipus d'operacions que es realitzen.

La producció de la vacuna recombinant amb la proteïna VP2 recombinant en el sistema *baculovirus-Sf9* es mostra prou atractiva, sobretot tenint en compte les evidències ja recollides en aquest treball sobre l'activitat del candidat vacunal. El principal aspecte on es podrien aconseguir millores notables és la definició de nous medis per la pròpia companyia per a abaratir-ne els costos.

Als resultats de l'anàlisi econòmic s'observa que el sistema de producció de la vacuna clàssica amb virus inactivats és el que ofereix uns marges econòmics més limitats. No obstant, cal indicar que aquesta és una metodologia ben establerta, ja que ha estat la primera a instal·lar-se a nivell industrial, i en molts casos pot obtenir-se un profit econòmic. S'ha de tenir en compte que els resultats que s'han obtingut en el sistema de IBDV-*Vero* es deu a la baixa (i poc habitual en sistemes vírics) eficiència d'infecció, obtenint-se com a molt uns 25 virus per cèl·lula infectada. Per tant, s'ha de considerar que en cas d'obtenir una replicació vírica de



500-1000 virus per cèl·lula (valor normal en sistemes vírics), els resultats serien absolutament diferents, ja que probablement esdevindria molt rendible. Per tant, resulta aconsellable desenvolupar un estudi on es conjuguin els virus IBD amb diferents tipus de cèl·lules receptores, per tal de poder assolir uns índex de replicació vírica adequats. Per a poder quantificar l'efecte que tindria obtenir un valor de replicació vírica de 500 virus/ cèl·lula infectada, es refan els càlculs inicials pel disseny de la planta, els resultats dels quals es mostren a la Taula 9-8.

<b>IBDV-Vero (500 virus/cèl·lula)</b>	
Nombre de dosis/any	$5,00 \cdot 10^8$
Partícules víriques/dosi virus total anual	$1,00 \cdot 10^6$ $5,0 \cdot 10^{14}$
% recuperació purificació virus total anual al reactor	90 $5,6 \cdot 10^{14}$
Estratègia de cultiu	Discontinuu infectat
Medi de cultiu	MEMG + cytodex 3+10% FBS
Cost medi cultiu (€/Litre)	21
Temps del cultiu (h)	216
Temps preparació bioreactor (h)	24
Temps cycle productiu (h)	240
Nombre de cicles/any	33
Concentració vírica (PI/L)	$4 \cdot 10^{11}$
Volum total anual (L)	$1,39 \cdot 10^3$
Volum reactor teòric (L)	42,09
Volum reactor dissenyat (L)	45
Partícules virals/cicle	$1,8 \cdot 10^{13}$
Partícules virals/any	$5,9 \cdot 10^{14}$

Taula 9-8: Recull de paràmetres i càlculs inicials realitzats a partir de les dades hipotètiques per a l'anàlisi de la planta de producció de la vacuna clàssica basada en IBDV, a partir d'un índex de replicació de 500 virus/cèl·lula.

Com es pot observar, proporcionalment a l'augment de l'eficiència d'infecció, el volum del bioreactor de producció disminueix, i conseqüentment també ho fan la resta d'equips de la planta, i els costos d'operació (són necessàries unes 20 vegades menys de volum de medi). A més, no tan sols disminueix el volum dels equips sinó que també disminueix el nombre, ja que no es necessari tants passos per a augmentar el volum productiu del procés. Així doncs, el volum del bioreactor de producció és de 45 litres, el que significa una escala de volum típica de planta pilot, i no de planta industrial, per la qual cosa no té gaire sentit realitzar una simulació de la planta ja que no seria comparable, però no hi ha cap dubte que esdevindria el procés més rentable de tots.

Els processos basats en l'expressió de VP2 recombinant en *E.coli* i *P.pastoris* mostren un important potencial. Tot i que se'ls ha penalitzat amb uns elevats valors per la dosi vacunal efectiva (50 µg), l'anàlisi demostra que són els sistemes que poden oferir una millor viabilitat econòmica, degut a que bàsicament són sistemes que permeten assolir majors concentracions cel·lulars i quantitat de producte, fet que comporta la disminució dels costos d'operació. No obstant, com s'ha demostrat en aquest treball, requereixen un esforç notable en el desenvolupament en els aspectes més bàsics per tal d'aconseguir la correcta expressió de la proteïna recombinant o un fragment de VP2 immunològicament actiu, per tal d'obtenir uns clons més estables i productius.

<b><i>P. pastoris</i> <math>Y_{p/x} = 8\%</math></b>	
Nombre de dosis/any	$5,00 \cdot 10^8$
µgram Vp2/dosi	50
Kg VP2 total anual	25,0
% recuperació purificació	80
Kg VP2 total anual al reactor	31,250
Estratègia de cultiu	FB
Medi de cultiu	FBMS
Cost medi cultiu discontinu (€/Litre)	1,2
Cost medi addició (€/Litre)	1,6
Temps del cultiu (h)	95
Temps preparació bioreactor (h)	24
Temps cicle productiu (h)	119
Nombre de cicles/any	66
Concentració cel·lular (g PS/L)	100
Rendiment (gVP2/g PS)	0,08
Volum total anual (L)	$3,91 \cdot 10^3$
Volum reactor (L)	59
Volum reactor dissenyat (L)	65
Producte total per cicle (g)	416
Producte total anual (Kg)	27,46

Taula 9-9: Recull de paràmetres i càlculs inicials realitzats a partir del cas hipotètic de producció de la vacuna recombinant mitjançant *P.pastoris* amb un rendiment de producte-biomassa del 8%.

En l'anàlisi efectuat, malgrat haver hagut de fer una sèrie de suposicions en aquests casos, permet arribar a la conclusió que seria del tot recomanable invertir esforços en el desenvolupament del sistema d'expressió, en concret en *P.pastoris*, donat que ofereix un horitzó econòmic més favorable.

Homòlogament a l'estudi del hipotètic cas de producció de virus IBD amb un índex de replicació de 500 virus/cèl·lula, es realitza el càlcul d'un hipotètic clon de *P.pastoris* que

expressés VP2 (o un segment d'aquesta proteïna immunològicament activa), que oferís uns nivells d'expressió mitjans segons les dades bibliogràfiques, fixant un valor del 8% de producte respecte el pes sec del llevat, els resultats del qual es mostren a la Taula 9-9.

Els resultats dels càlculs realitzats, permeten disminuir proporcionalment el volum de la planta de producció, i el nivell d'escala obtingut (igual que en el cas del IBDV) pertany a una planta pilot amb un bioreactor productiu d'un volum de 65 litres, en el qual no té sentit realitzar les simulacions, però sense cap mena de dubte es reduiria el cost de producció de forma substancial.

Cal dir que, en el camp de la indústria, aquest tipus de processos permeten generar plantes amb gran versatilitat. És a dir, en comptes de construir una planta amb les dimensions necessàries per a la producció anual d'aquest únic producte a tot rendiment, el que resulta més atractiu i rendible és conceptualitzar una planta de més volum que permeti realitzar les produccions de diferents processos (i per tant de productes). Per tant, s'obté una planta molt més versàtil, que pot allotjar diferents sistemes productius, de manera que ofereix més estabilitat industrial ja que no centra tot el seu benefici a les ventes d'un sol producte, fet que augmenta el risc a expenses del desenvolupament i evolució subjecte al mercat d'aquest producte. Per altra banda, el fet de coexistir diferents processos per un mateix equipament suposa que els costos associats a la producció que deriven del cost de les instal·lacions, s'hauria de repartir entre tots els processos. Aquest fet resulta important degut a que a l'anàlisi dels costos d'operació dels quatre casos estudiats, aquest cost s'ha quantificat en un valor entre un 40 i un 60%, dels costos anuals d'operació. Per tant, si es conceptualitzés una planta que disposés, per exemple, de quatre processos productius diferents, el cost absolut de les instal·lacions associable a cada procés es reduiria a una quarta part. Si es trasllada aquesta reducció als casos estudiats anteriorment, el cost atribuïble a les instal·lacions respecte el cost total d'operació anual seria entre un 13 i un 28%, o expressat d'una altra manera, el cost total d'operació disminuiria entre un 28 i un 46%, amb el conseqüent augment dels beneficis bruts i de la rendibilitat del procés.

## **9.5. Bibliografia.**

Benavides, J; Mena, JA; Cisneros-Ruiz, M; Ramirez, OT; Palomares, LA. i Rito-Palomares, M. 2006. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*. 842:48-57.

Clare, J. J.; Rayment, F. B.; Ballantine, S. P.; Sreekrishna, K. i Romanos, M. A. 1991. High-Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia Pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Nature Biotechnology*. 9:455-460.

Cregg, JM; Tsxhopp, JF; Stillman, C; Siegel, R; Akong, M; Craig, WS; Buckholz, RG; Madden, KR; Kellaris, PA; Davis, GR i altres. 1987. High level expression and efficient assembly of the Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 5:479-485.

Deutscher, MP. 1990. Guide to protein purification. In: *Methods in Enzymology*. Abelson J i Simon M, Editors. San Diego, USA.

GEHealthcare. 2005. *Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods*. GE Healthcare.

Harrison, RG; Todd, P; Rudge, SR i Petrides, DP. 2000. *Bioseparations science and engineering. Handbook*.

Jahic, M.; Veide, A.; Charoenrat, T.; Teeri, T. i Enfors, S. O. 2006. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*. 22:1465-1473.

Kramer, W; Elmecker, G; Weik, R; Mattanovich, D i Bayer, K. 1996. Kinetic studies for the optimization of recombinant protein formation. *Ann NY Acad Sci*:323–333.

Lai, CS; Hopwood, LE i Swartz, HM. 1980. ESR studies on membrane fluidity of *Chinese hamster ovary cells* grown on micorcarriers and in suspension. *Experimental Cell Research*. 130:437-442.

Li, X; Feldman, S; Valle, M; Terpening, S; Clanton, D i Wu, F. 2004. Improved vaccina virus recovery for Cell-Cultured Smallpox Vaccine (CCSV). 227<sup>th</sup> ACS National Meeting. Anaheim, United States.

Lueking, Angelika; Holz, Caterina; Gotthold, Christine; Lehrach, Hans i Cahill, Dolores. 2000. A System for Dual Protein Expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 20:372-378.

Manousos, M; Ahmed, M i C, Torchio. 1980. Feasibility studies of oncornavirus production on micorcarrier cultures. *In vitro*. 16:507-515.

Omar, AR; Kim, CL; Bejo, MH i Ideris, A. 2006. Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Veterinary Science*. 7:241-247.

Paredes, C. 1998. Anàlisi i redistribució dels fluxes metabòlics en cèl·lules animals. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Peters, M i Timmerhaus, K. 1991. Plant design and economics for chemical engineers. 4<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill. New York.

**10. CONCLUSIONS.**



Al llarg d'aquest treball s'ha estudiat la producció d'una vacuna contra la malaltia de Gumboro (la vacuna clàssica i una alternativa de vacuna recombinant), aplicant les eines de l'anàlisi de bioprocés. Per a fer-ho s'han considerat fins a quatre alternatives de sistemes biològics, i en totes elles s'ha desenvolupat el treball des de la perspectiva de desenvolupar processos robusts, relativament senzills, i implementables a nivell industrial.

D'aquesta manera, s'ha pogut obtenir per a cadascuna de les quatre alternatives un bioprocés de referència, que al seu temps s'ha pogut analitzar en termes de viabilitat econòmica i de rellevància industrial. Aquesta anàlisi es mostra molt útil a l'hora d'identificar les principals àrees on caldria efectuar millores per tal d'augmentar la rendibilitat dels bioprocessos plantejats.

Cal fer esment que aquesta anàlisi s'ha fet amb les quatre alternatives, malgrat que en aquest treball, en dues d'elles no s'ha pogut demostrar de forma complerta la possibilitat d'expressar la proteïna recombinant d'interès (la proteïna VP2), si més no, de forma estable. En aquests dos casos (*E.coli* i *P.pastoris*), s'han realitzat els estudis de producció amb una altra proteïna model ( $\beta$ -galactosidasa), i amb els bioprocessos posats a punt s'ha realitzat l'anàlisi de viabilitat. Evidentment, aquests escenaris només són plantejables realment si aquesta limitació pot ésser superada, fet que es considera factible, malgrat sigui necessari un treball més exhaustiu i en profunditat en aquesta direcció. Precisament, de l'anàlisi de viabilitat i dels bioprocessos efectuats, es desprèn que el bioprocés amb més potencialitat és el basat en el sistema *P.pastoris*, sempre que s'assoleixi l'expressió estable de VP2. Per tant, amb aquesta aproximació ja es pot fer una recomanació important de quina és la ruta que s'hauria de seguir en esforços posteriors a aquest treball.

Durant el desenvolupament d'un bioprocés s'han de considerar les accions oportunes en cadascuna de les àrees que el componen (Figura 10-1), per a aconseguir una millora global de l'eficiència del bioprocés. Tot el conjunt d'eines que es poden aplicar en cadascuna de les àrees cerquen l'increment de la productivitat volumètrica (producte entre la concentració de biocatalitzador i la productivitat específica d'aquest,  $P_V = P_e \cdot X_V$ ), i de la rendibilitat econòmica.

Per tant, la millora de la productivitat volumètrica pot ser deguda a un augment de la productivitat específica, a un augment de la concentració de biocatalitzador actiu o a ambdues coses. Cal dir que, tot i que es pugui treballar en una de les àrees concretes, totes elles estan interrelacionades, i qualsevol canvi centrat en una d'elles pot influir en altres àrees del bioprocés. En cadascun dels sistemes proposats, s'han estudiat i proposat millores en



aquelles àrees que s'han identificat com a més crítiques, amb l'expectativa d'obtenir un augment de l'eficiència del bioprocés, és a dir, augmentar la concentració de biocatalitzador o bé incrementar la productivitat específica.

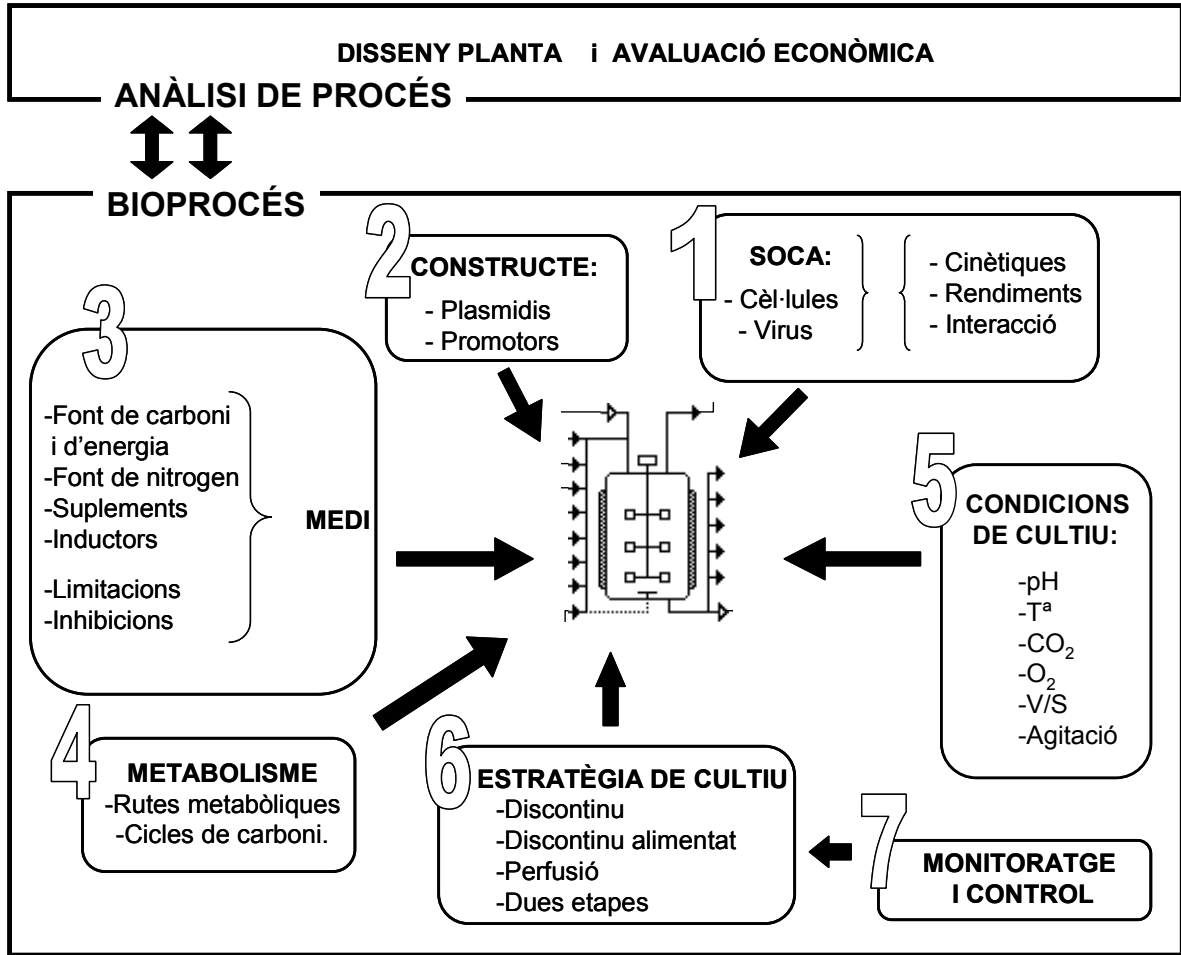


Figura 10-1: Esquema de les diferents àrees que han estat estudiades en les alternatives dels bioprocessos plantejats en aquest treball. A partir d'una proposta inicial d'un bioprocés, es pot realitzar el seu anàlisi que permetrà identificar en quina àrea s'ha de focalitzar els esforços en busca de millores. Les diferents àrees pertanyen a diferents disciplines, i es destaquen les següents: La realització del constructe, estudi de les soques (cèl·lules i virus) i les seves interaccions, el medi de cultiu, el metabolisme, les condicions de cultiu, l'estratègia de cultiu i el monitoratge i control del bioprocés.

De forma global, es podria concloure que, en el cas de que aquestes anàlisis es volguessin utilitzar per a definir els candidats millors a l'hora de portar-los a la seva implementació industrial, es realitzaria una doble recomanació. En primer lloc, s'optaria per a sistemes d'expressió de la vacuna recombinant basada en VP2, donada la seva més gran bioseguretat, i concretament en el sistema *baculovirus-Sf9*, ja que és l'únic en que s'ha aconseguit l'expressió efectiva de la vacuna recombinant i la seva implementació seria la més ràpida. En segon lloc, i simultàniament a la implementació d'aquest bioprocés, es recomanaria un treball de recerca a nivell d'enginyeria cel·lular i molecular en el sistema *P.pastoris*, per

aconseguir l'expressió de VP2, comprovar la capacitat immunogènica del candidat, i realitzar una nova anàlisi de procés, que molt probablement resultaria prou rendible per a substituir el procés de *baculovirus-Sf9*. Si per altres criteris es volgués efectuar una producció de la vacuna amb virus nadiu inactivat, aleshores es recomanaria un primer pas d'optimització de la infecció, treballant en línies cel·lulars alternatives a les cèl·lules *Vero*.

Pel que fa a cada sistema concret es poden ressaltar les següents conclusions:

#### **IBDV-Cèl·lules *Vero*:**

Aquest bioprocés té l'avantatge de produir directament el virus nadiu, que una vegada inactivat serveix per a formular la vacuna, implicant un procés de purificació relativament senzill. No obstant, la seva rendibilitat econòmica no és massa elevada. Això és degut a la baixa eficiència en la interacció entre els dos sistemes biològics, el virus i la cèl·lula receptora, que únicament permet obtenir índexs de replicació força baixos.

Tot i que la modificació de les condicions de la infecció, entre les quals destaca l'augment de concentració de CO<sub>2</sub> en el medi de cultiu, permet millorar el procés d'infecció en bioreactors, l'anàlisi d'aquest bioprocés indica que el factor clau per a obtenir millores substancials recau en augmentar l'índex de replicació vírica (actualment al voltant de 25-30 virus per cèl·lula).

Per aconseguir aquesta millora del procés infectiu es proposen dues alternatives. D'una banda, identificar el receptor que pot ser reconegut pel virus IBD, i que permet una bona interacció entre els organismes, i la consegüent infecció de la cèl·lula receptora. Una vegada identificat el receptor, modificar genèticament la soca de cèl·lules *Vero* perquè l'expressi en quantitats suficients, de manera que augmenti l'eficiència d'infecció. D'altra banda, l'opció més interessant i senzilla seria estudiar la possibilitat d'usar altres línies cel·lulars receptores, amb les que es pugui obtenir un millor índex de replicació.

Assolir un índex de replicació vírica al voltant de 500 o 1000 virus per cèl·lula oferiria uns resultats de l'anàlisi de procés absolutament diferents, resultant un bioprocés força atractiu i viable, ja que permetria reduir els volums de producció entre 10 i 20 vegades.

### **Baculovirus-Sf9:**

Dels diferents sistemes d'expressió del candidat vacunal recombinant, VP2, és l'únic que presenta una expressió eficaç de la proteïna. L'anàlisi de rendibilitat del bioprocés, tot i millorar el resultat obtingut en el sistema de producció de la vacuna clàssica, és menys prometedora que les potencialment possibles en els sistemes bacterià i de llevats. Per a millorar els resultats es proposa augmentar la productivitat volumètrica, ja sigui incrementant la productivitat específica, o augmentar la concentració cel·lular a infectar.

Per millorar la productivitat específica, es proposen diferents opcions. En primer lloc, la utilització d'altres promotors d'expressió forts del sistema de baculovirus, i realitzar la inserció del gen que codifica per VP2 sota la regulació de diferents promotors simultàniament, o bé expressar més còpies de la proteïna. En segon lloc, explorar la possibilitat de canviar la soca de cèl·lules receptores per altres línies cel·lulars d'insecte, com Sf21, Tn368 (*Trichoplusia ni*), o Mb (*Mamestra brassicae*).

Amb el medi finalment escollit, IPL-41 amb suplement i un 5% de FBS, l'estratègia de cultiu més rendible és el discontinu. L'ús d'estratègies de cultiu d'alta densitat cel·lular en perfusió, permet assolir millores tant a nivell de concentració cel·lular com de producte. La limitació en estratègies que a priori poden resultar més rendibles, com el discontinu alimentat, és causada per l'acumulació d'un subproducte tòxic. Una opció de millora seria treballar en el desenvolupament de medis específics per a cultius en discontinu alimentat, que presentin un comportament optimitzat i la reducció de l'excreció de subproductes metabòlics tòxics, permetent assolir densitats cel·lulars més elevades.

Mitjançant el monitoratge de la velocitat de consum d'oxigen de l'organisme (OUR) és possible desenvolupar un sistema d'automatització del procés, incloent-hi la detecció del moment d'infecció (TOI) i del moment de recollida del producte (TOH), a partir de metodologies de detecció en línia que no havien estat descrites fins al moment. Aquest desenvolupament permet establir un sistema productiu robust i automatitzat, que es pot fer extensible a altres processos, incloent-hi els d'aquest mateix treball.

### ***Escherichia coli:***

El sistema bacterià ofereix uns resultats potencials de rendibilitat, a partir de l'avaluació econòmica, entre *P.pastoris* i *baculovirus-Sf9*. Com s'ha comentat, els estudis es basen en el sistema d'expressió de  $\beta$ -galactosidasa, degut a que no s'ha aconseguit un clon productiu estable que permeti l'expressió de VP2. Per tant, l'esforç principal per a poder superar les limitacions d'aquest sistema s'ha de centrar en l'obtenció d'una soca raonablement productiva i estable.

Així doncs, s'aconsella aprofundir en els treballs d'enginyeria molecular, i es proposa una estratègia alternativa. Aquesta consisteix en identificar clarament el fragment immunogènic del candidat vacunal VP2, i estudiar la possibilitat de construir una soca que expressi únicament aquest fragment, en el supòsit que no sigui tòxic per a la bacteria. La metodologia pot consistir en anar retallant consecutivament els extrems de la proteïna expressada, disminuint així la seva mida. Posteriorment, de les diferents construccions generades, comprovar quines mantenen la capacitat immunogènica, i de les soques corresponents, comprovar quines són estables. És a dir, intentar truncar la proteïna per aconseguir extreure la seqüència que causa la inestabilitat, sense perdre la capacitat immunogènica.

Per altra banda, l'avaluació econòmica d'aquest sistema mostra un cost elevat, degut a l'ús d'IPTG com a inductor de l'expressió. Aquests resultats duen a proposar l'estudi de l'ús d'inductors alternatius més econòmics, com per exemple la lactosa, que resulta ser al mateix temps font de carboni i d'energia, a més d'inductor de l'expressió de la proteïna heteròloga. Aquest canvi implica el desenvolupament del sistema de monitoratge i de control per l'addició de lactosa, ja que al contrari que l'IPTG, és consumida pel bacteri.

### ***Pichia pastoris:***

Aquest sistema ofereix una sèrie de potencialitats molt interessants des del punt de vista del procés, com s'ha pogut veure en l'anàlisi feta en base als cultius d'alta densitat cel·lular desenvolupats en aquest treball, usant la  $\beta$ -galactosidasa com a proteïna model. Es tracta d'un sistema senzill, que permet assolir concentracions de cèl·lules i de producte elevades, amb una estratègia de cultiu senzilla i amb baixos costos associats als components del medi de cultiu. Aquesta és la raó bàsica per la qual aquest sistema ofereix la millor rendibilitat potencial.

El factor a superar, i absolutament necessari per a poder explotar les potencialitats mencionades, és obtenir una soca amb un bon nivell d'expressió de la proteïna recombinant definida com a candidat vacunal, VP2. Els intents realitzats en aquesta direcció al llarg del treball, no han aconseguit assolir aquest objectiu, i per tant seria l'àrea en la que caldria dedicar els majors esforços en futurs treballs.

Una altra via que es pot explorar i que no s'ha pogut realitzar al llarg d'aquest treball, és l'ús de plasmidis que atorguin al sistema d'expressió la capacitat d'excretar la proteïna heteròloga, per a poder comparar aquesta alternativa amb el sistema d'expressió intracel·lular, mitjançant l'anàlisi de procés.

Finalment, es vol insistir en la idea de que per a obtenir bioprocessos productius rendibles, o millorar l'eficiència de bioprocessos ja existents, és necessari considerar cada una de les millores que es poden aportar en cadascuna de les àrees que intervenen en els bioprocessos: des de la selecció de la soca productiva i del constructe a utilitzar, passant per l'estudi del metabolisme i la conseqüent definició del medi de cultiu i de l'estratègia d'operació més apropiada (que permetin aconseguir altes concentracions de biocatalitzador i per tant millor productivitat), salvant els possibles contratemps generats per les característiques del metabolisme, mantenint el cultiu sota condicions controlades en tot moment per un sistema de monitoratge i control que permeti optimitzar el bioprocés.

**11. MATERIALS I MÈTODES.**



## **11.1. Biocatalitzadors.**

### **11.1.1. Organismes utilitzats.**

Al llarg d'aquest treball s'utilitza un nombre considerable d'organismes, uns destinats als sistemes productius de forma directa o indirecta (cèl·lula productora, o bé cèl·lula cèl·lula receptora), mentre que d'altres s'utilitzen en el procés de construcció i obtenció dels clons de les soques productives.

#### **Cèl·lules Vero.**

És una línia de mamífer aïllada inicialment del epitelí del ronyó del *mono verd africà*. Degut al seu origen, és a dir, que conformava un teixit animal, com a principal característica es destaca la seva dependència d'una superfície on ancorar-se per a poder créixer i dividir-se, per tant és una línia anclatge-dependent. La soca de cèl·lules *Vero* s'utilitza com a cèl·lula receptora per a suportar la infecció del virus IBD, que configura el propi producte.

#### **Virus IBDV, Infecció Bursal Disease Virus.**

La línia de IBDV ha estat cedida i pertany a l'empresa amb la que s'ha establert la col·laboració, i la informació al respecte està protegida sota conveni de confidencialitat.

#### **Cèl·lules Sf9, *Spodoptera frugiperda* 9.**

En aquest treball s'utilitza una línia cel·lular d'insecte *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*), línia cel·lular que originalment va ser aïllada de la larva de la libèl·lula del mateix nom. És el biocatalitzador que serveix com a cèl·lula receptora per a la infecció amb baculovirus recombinant. La línia de Sf9 té la capacitat de créixer en suspensió en sistemes agitats, però s'adhereix sobre la superfície del flascó en cultius estàtics, tot i que el seu desancorament és senzill amb un simple treball mecànic, impulsant medi amb una pipeta sobre la superfície.

Aquesta línia cel·lular ha estat cedida per l'empresa LABORATORIOS HIPRA S.A. d'Amer (Girona).



### **Baculovirus recombinant.**

La línia AcVP2.IBDV és una línia de baculovirus, concretament la AcYM1 en la que mitjançant les tècniques de DNA recombinant, es clona el gen que codifica la proteïna VP2 (el candidat vacunal triat), que immunitza en les aus contra el virus IBD (Infectal Bursal Disease Virus). La inserció del gen de la VP2 es realitza en la localització del gen de la polihedrina.

La línia de baculovirus ha estat cedida per l'empresa INGENASA de Madrid.

### **Soques del bacteri d' *Escherichia coli*.**

#### **M15[prep4].**

La M15 és una soca comercial de QIAGEN derivada de la soca *E. coli* K12. S'usa com a soca productora de tant de la VP2 com de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa.

En el seu genoma es localitza una deleció en el gen *lacZ*, que li impedeix de créixer en medis amb presència d'Ampicil·lina. És una característica que permet emprar plasmidis que incorporin el gen *lacZ*, per a la seva posterior selecció dels clons positius.

Genotip:  $mal^s$ ,  $str^s$ ,  $rif^s$ ,  $thi^-$ ,  $lac^-$ ,  $ara^+$ ,  $gal^+$ ,  $mtl^-$ ,  $F^-$ ,  $recA^+$ ,  $uvr^+$ ,  $lon^+$

#### **DH5 $\alpha$ .**

La soca DH5 $\alpha$  és una soca comercial d'Invitrogen que s'usa per a la propagació i extensió dels vectors o plasmidis per a la posterior clonació del constructe a la soca productora, ja siguin organismes bacterians o llevats.

Genotip:  $F^-$ ,  $80dlacZ \Delta M15$ ,  $endA1$ ,  $recA1$ ,  $hsdR17 (r_k^-, m_k^+)$ ,  $supE44$ ,  $thi^-$ ,  $gyrA96$ ,  $relA1$ ,  $\Delta(lacZYA-argF)U169$ ,  $\lambda^-$ .

### **Soques del llevat *Pichia pastoris*.**

La soca de *Pichia pastoris* prové dels controls positius del kit de Invitrogen per a la construcció de soques productores (*Pichia* Expression Kit, Protein expression, N<sup>o</sup> catàleg

K1710-01). El control positiu consisteix en un soca de *Pichia* anomenada GS115 ( $\beta$ -galactosidasa), on el gen *Lacz* ha estat integrat en el loci *his4*, esdevenint una soca histidina dependent ( $\text{His}^-$ ). Del fenotip de la soca destaca que és  $\text{Mut}^+$ , és a dir que és capaç de duplicar-se emprant únicament el metanol com a font de carboni.

### **11.1.2. Manteniment de les diferents línies cel·lulars.**

#### **Cèl·lules animals.**

Les línies cel·lulars de *Vero* i *Sf9* emprades en el treball es conserven en criotubs congelats en nitrogen líquid a una temperatura de  $-196^\circ\text{C}$ . En el moment en que s'ha d'iniciar un experiment es descongela un dels criotubs i s'inicia un cultiu en suspensió de les cèl·lules. Cada cultiu pot ésser ressebrat consecutivament durant un període no superior a tres mesos.

Si es desitja preservar alguna de les sublínies obtingudes durant el treball es procedeix a la seva congelació i conservació en nitrogen líquid. El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és d'extrema importància, per aquest motiu cal comprovar regularment l'absència de contaminacions.

#### **Congelació.**

En el procediment per a congelar les línies cel·lulars utilitza com a Medi 0 el mateix que s'empra per al subcultiu de les cèl·lules. S'anomena Medi 0 de forma genèrica.

Per la preparació d'un estoc de 10 criotubs (Nunc, 377267) de cèl·lules congelades els passos a seguir són els que es mostren a continuació. Cal tenir en compte però, que abans de procedir a la congelació de la línia cel·lular és important que les cèl·lules estiguin a la meitat de la fase exponencial de creixement i que la viabilitat sigui alta ( $>90\%$ ).

Es fan créixer entre 200 i 250 ml d'un cultiu de cèl·lules fins que es trobin a la meitat de la fase exponencial (aproximadament a les 48 hores de cultiu).

Es preparen els medis de congelació:

MEDI I: Medi 0 amb 10% (v/v) de FBS (5 ml de FBS + 45 ml de Medi 0). Es manté a temperatura ambient.

MEDI II: Medi 0 amb 10% de FCS (v/v) i 20% (v/v) de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma, D-2650) (1 ml de FBS + 2 ml de DMSO + 7 ml de Medi 0). Es manté a 4°C.

Es transfereixen els cultius a congelar (200-250 ml) a tubs de centrifuga estèrils de 50 ml (Nunc, 339497) i es centrifuguen a 500 g durant 5 minuts.

Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb un total de 40 ml de medi I. S'agafa una alíquota per tal de determinar la concentració i la viabilitat cel·lular.

A partir de la concentració de cèl·lules vives es calcula el volum de medi amb que cal resuspendre el cultiu després de la propera centrifugació per tal d'obtenir una concentració final de  $8 \times 10^6$  cèl·lules vives/mL.

Es centrifuguen els 40 ml a 500 g durant 5 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb la meitat del volum calculat anteriorment de medi I. Les cèl·lules s'incuben 10 minuts a 4°C.

S'afegeix lentament l'altra meitat del volum, en aquest cas de medi II (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 en el moment d'afegir el Medi II la cèl·lula es trobi a 4°C, i que l'addició es faci lentament per tal d'evitar un xoc osmòtic.

Es transfereix la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta amb gel. A cada criotub es posa 1 ml de la suspensió. La solució final en la que les cèl·lules es mantindran congelades té un 10% de FBS i DMSO (0.5 ml de medi I i 0.5 ml de medi II). Els criotubs es porten ràpidament al congelador de -80°C . A les 24 hores es transfereixen els criotubs al contenidor de nitrogen líquid.

## **Descongelació**

La descongelació ha de ser un procés ràpid per tal d'assegurar una recuperació òptima de la cèl·lula. El procés de descongelació consta dels següents passos:

Es preparen els medis de descongelació:

MEDI III: Medi 0 amb 20% (v/v) de FBS (4 ml de FCS + 16 ml de Medi 0). Es reparteixen 10 ml d'aquest medi en 2 tubs de centrifuga estèrils (Nunc, 339497) i es posen a 37°C.

MEDI IV: Medi 0 al 5% (v/v) de FBS i es manté a 37°C.

S'agafa un criotub del congelador de nitrogen líquid i es posa a l'incubador a 37°C. És important que la suspensió cel·lular no es deixi més temps del necessari per a descongelar-se ja que el medi de congelació porta DMSO, que és tòxic per a les cèl·lules.

Quan el contingut del criotub s'ha descongelat s'afegeixen unes gotes dels 10 ml de medi III preescalfat a 37°C, s'homogeneïtza la suspensió cel·lular amb una pipeta estèril i es transvasa tot el contingut al tub de centrifuga que conté la resta dels 10 ml de medi III.

Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts i s'elimina el sobrenedant per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació. Es realitza un segon rentat resuspenent les cèl·lules amb els 10 ml de medi III restants.

Es treu una mostra i es fa un recompte de les cèl·lules vives. Es calcula el volum de medi IV que caldrà afegir per a tenir una concentració cel·lular de  $5 \times 10^5$  cèl·lules vives/mL. Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts.

S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb el volum de medi IV calculat anteriorment. Es transfereix aquesta suspensió cel·lular a un flascó de cultiu i es manté a 37°C dins l'incubador.

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 a eliminar les restes de DMSO. Per aquest mateix motiu, és important no utilitzar un inòcul inferior a  $2 \times 10^5$  cèl·lules vives/mL.

### **Manteniment de les soques en cultiu.**

El manteniment en cultius de les dues línies cel·lulars es realitza amb els medis anomenats Medi 0 de forma genèrica.

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven en flascons de 75 cm<sup>2</sup> durant un període màxim de tres mesos. En el cas de cultiu de cèl·lules adherents no s'aconsella la utilització de flascons de 25 cm<sup>2</sup>, ja que la superfície d'adhesió és massa petita. L'inòcul utilitzat és de 2-3·10<sup>5</sup> cèl·lules vives/mL, els cultius es ressempren cada 3-4 dies, quan les cèl·lules es troben en plena fase exponencial, en 20 ml de Medi 0 fresc. D'aquesta manera es proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaustint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines o components del sèrum) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (amoni i lactat que acidifica el medi).

El procediment per fer el subcultiu o ressempre de les línies cel·lulars es descriu a continuació per les línies que creixen en suspensió. Pel que fa a les línies cel·lulars que creixen en adherència cal realitzar prèviament el desancorament, i a continuació procedir al recompte.

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 invertit de contrast de fases. Cal esmentar que en el cas de la ressempre de les cèl·lules *Vero* es necessita d'una etapa de tripsinització per a poder ser desancorades, mentre que en el cas de les cèl·lules *Sf9* és suficient amb un treball mecànic, impulsant medi a través de la pipeta, per desancorar-les.

Es calcula del 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:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

On  $V_1$  és el volum de cultiu vell en ml que cal centrifugar,  $V_2$  el volum de Medi 0 fresc del cultiu nou (en aquest cas 10 ml),  $C_1$  la concentració de cèl·lules vives que s'ha comptat prèviament en el cultiu vell ( $n \times 10^5$  cèl·lules vives/mL) i  $C_2$  l'inòcul que es vol tenir en el cultiu nou (en aquest cas  $2-3 \times 10^5$  cèl·lules vives/mL).

S'afegeixen 10 ml de Medi 0 fresc en el nou flascó de cultiu i s'incuba a 37°C i a una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> per temperar i equilibrar el pH del medi.

Es centrifuga el volum del cultiu vell calculat prèviament ( $V_1$ ), a 500 g durant 5 minuts. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb els 10 ml de Medi 0 fresc que

estaven a 37°C. El nou cultiu s'incuba a 37°C en una atmosfera al 90% d'humitat i 5% de CO<sub>2</sub>. Aquesta operació es va repetint cada 2-3 dies durant els tres mesos mesos en que es manté la ressembrança de les cèl·lules.

### **Protocol de tripsinització de cultius de cèl·lules Vero.**

En el cas de les cèl·lules adherents per poder realitzar una ressembrança o simplement poder disposar de les cèl·lules adherides en un flascó, primerament s'ha de desenganxar les cèl·lules de la superfície de creixement. L'ús de la tripsina (enzim que degrada les proteïnes d'adhesió), és el protocol més emprat. A continuació es descriu el protocol per a un flascó de 75 cm<sup>2</sup>, un dels tipus més habituals

Retirar el sobrenedant.

Afegir 1 ml de solució de tripsina (Gibco 25300, 0,05% trypsin-EDTA) i incubar a 37°C durant uns 5 minuts. S'ha d'anar comprovant visualment si les cèl·lules es desenganxen, i no es pot allargar aquest pas més temps del necessari, per evitar que els efectes de la tripsina puguin degradar la membrana de la cèl·lula.

Un cop desenganxades, afegir 5 ml de medi amb 10% de sèrum i homogeneïtzar. El sèrum degut al seu alt contingut proteic inhibeix l'efecte de la tripsina sobre les cèl·lules.

Si es desitja ressemar un flascó, s'ha de recomptar la concentració cel·lular per poder calcular la alíquota a centrifugar.

Centrifugar a 1000 rpm durant 5 minuts a 25 °C.

Descartar el sobrenedant i resuspendre el pelet en el volum de medi fresc desitjat. És important no deixar més temps del compte el pelet sense resuspendre per evitar la formació d'agregats cel·lulars. També és necessària una bona homogeneïtzació de la suspensió abans de realitzar la ressembrança. La concentració cel·lular per unitat de superfície en que es realitzen les ressembres dels cultius en suspensió és de 3-4·10<sup>4</sup> cèl·lules/cm<sup>2</sup>.

### **Els microsuports: Cytodex 3.**

Els microsuports per aportar superfície d'ancoratge als cultius agitats (bioreactors i als flascons agitats), i tenen una estructura esfèrica. El tipus de microsuports utilitzat és el Cytodex 3 de GE Healthcare, les característiques principals del qual es recull a continuació:

---

Densitat	1,04 (g/mL)
Diàmetre mitjana	175 (µm)
Àrea	2700 (cm <sup>2</sup> /g pes sec)
Factor hidratació	15 (ml PBS/ g pes sec)

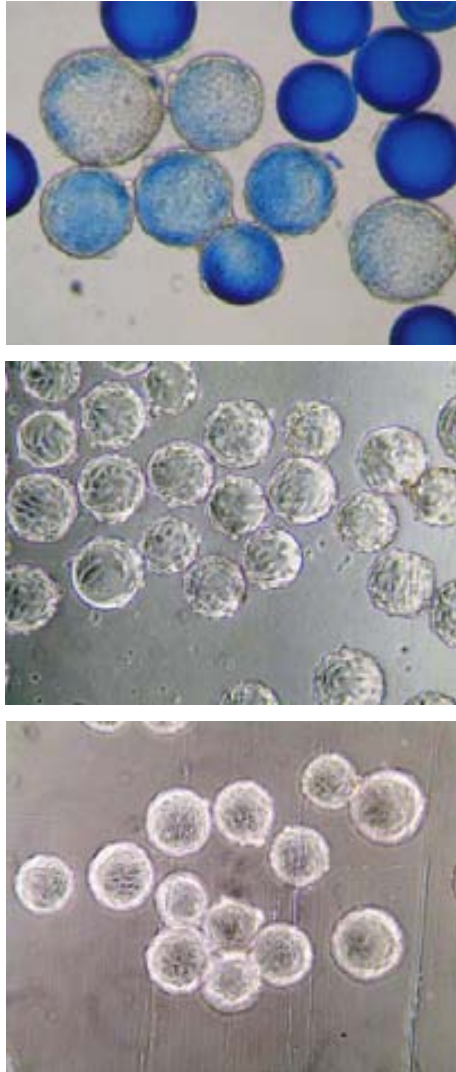
---

Aquest tipus de microsuport està fet de dextrà i cobert per una fina capa de col·lagen desnaturalitzat sobre el que les cèl·lules s'adhereixen. La capa de col·lagen és susceptible de ser digerida per una varietat de proteases com la tripsina o la col·lagenasa, fet que facilita la capacitat de recuperació de cèl·lules amb un rendiment elevat.

### **Protocol d'ancorament sobre microsuports de Cèl·lules Vero.**

L'ancorament es realitza utilitzant sempre la mateixa relació de cèl·lules-superfície que en cultius en estàtic (aproximadament  $3\cdot 4\cdot 10^4$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>), però al contrari que en els cultius estàtics, es pot observar una distribució de cèl·lules no homogènia restant microsuports sense colonitzar (Figura 11-1-A).

Tot i que en un principi aquesta línia cel·lular té una certa capacitat de migrar (colonització de suports amb cèl·lules provinents d'altres micro-suports), no resulta efectiu per a aconseguir una total colonització de tota la superfície disponible. Per aquest motiu s'opta per provocar unes aturades intermitents a l'agitació per afavorir el contacte microsuport-cèl·lula i permetre una millor homogeneïtzació de la colonització. Les aturades es realitzen durant la primera hora del cultiu cada 10 minuts, aturant l'agitació durant 5 minuts, temps suficient per decantar la totalitat dels microsuports i bona part de les cèl·lules.



---

Figura 11-1: Imatges de microscòpia electrònica de mostres de cultiu sobre microsuports cultivats en flascons agitats. A) Colonització sense aturades d'agitació. B) Colonització a les 192 hores de cultiu amb aturades d'agitació. C) Colonització a les 220 hores de cultiu amb aturades d'agitació.

---

Com s'observa a la Figura 11-1 B i C la colonització dels microsuports és total en un cultiu sense infecció en flascó agitat a les 192 i 220 hores. D'altra banda, com s'observa en la fotografia després de 220 hores de cultiu, es produeix un fenomen que es pot anomenar de supra-confluència, és a dir que un cop esgotada la superfície d'ancoratge, i encara que hi hagi contacte entre les cèl·lules, no s'inhibeix el creixement del cultiu, quedant la superfície saturada de cèl·lules, que possiblement es troben distribuïdes en més d'una capa.

### **Controls 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 fase, tenyit prèviament amb blau de tripà. A més 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 els medis. Per a realitzar aquest control es posa 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 fase. 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.

## **Bacteris i llevats.**

Degut a les característiques diferenciades dels organismes, els protocols de congelació i de descongelació, i de manteniment del cultius són diferents per als bacteris i per als llevats respecte les cèl·lules animals. La filosofia de treball és similar, de manera que un cop s'obté la soca productora seleccionada, aquesta es guardada en estocs congelats a -80°C. Al iniciar cada nova sèrie d'experiments es descongela un nou vial de l'estoc.

## **Congelació.**

Els cultius a congelar han de provenir de cultius que es trobin en fase de creixement exponencial, per tant es recomana realitzar un precultiu durant tota la nit en tub d'assaig de 10 ml de volum en un incubador orbital a 37 o 30 °C (per bacteris i llevats respectivament). Posteriorment s'inocula un erlenmeyer de 50 ml de volum amb el medi corresponent segons l'organisme i 0,5 ml del precultiu. Després de 5-8 hores pels bacteris o de 24 hores pels llevats, ja es pot procedir a preparar els vials de **congelació** (Cryo-beads, AES Laboratoire AEB400100).

Els vials venen preparats amb uns nuclis de plàstic submergits en glicerol (crioprotector), amb un volum total de 1,5 ml aproximadament. Es retira 0,5 ml de glicerol del

vial i s'hi afegeix 0,75 ml del cultiu de la soca a congelar. Seguidament s'agita suaument per inversió, i s'extreu el màxim de líquid fins tenir un nivell que cobreixi els nuclis, i es guarda al congelador de -80°C. Aquests estocs poden ser guardats durant 2 ò 5 anys al congelador, però es recomana recomprovar la capacitat de recuperació i d'expressió anualment i refer l'estoc del congelador.

### **Descongelació.**

La descongelació s'efectua directament del vial congelat sense ser necessària la seva descongelació completa. Amb una nansa de **kolle** estèril s'extreu curosament un nucli del vial i es resemblance una placa petri amb el medi degudament suplementat amb les marcadors de selecció i solidificat amb agar. Es cultiva la placa invertida en una estufa a la temperatura corresponent segons l'organisme. En 12-24 hores ja es pot observar creixement en la superfície de la placa, que ja pot ser protegida amb parafilm i desada a la nevera a 4°C.

### **Manteniment des les soques en cultiu.**

Degut a la ràpida cinètica de creixement d'aquest tipus d'organismes, i a la capacitat de resistència i recuperació de la que disposen, mentre es treballa en experiments de curta durada la soca es guarda a la nevera en plaques de medis solidificats amb agar (entre 15 i 20 g/L). La vida d'un cultiu en placa a la nevera és d'aproximadament d'una o dues setmanes, qüestió que implica que s'ha de ressemblar setmanalment. En soques recombinants és important que el medi de cultiu sempre incorpori els marcadors de selecció, de manera que garanteixi que el cultiu duu el constructe desitjat, i evitar que aquest es perdi en les consecutives generacions.

## **11.2. Medis de cultiu.**

Els medis de cultiu difereixen molt en funció de l'organisme que s'utilitza. Normalment per soques de línies cel·lulars d'animals els medis s'adquireixen ja preparats, bé sigui en format líquid o en pols. Als que es compren en format líquid només els hi resta afegir els suplementes o antibiòtics necessaris, que provenen de solucions estoc estèrils. Pels medis que es compren en pols, només cal pesar la quantitat necessària, addicionar els suplementes o les sals restants en format sòlid corresponents i dissoldre-ho en aigua ultrapura obtinguda en un

aparell d'ultrafiltració Milli-Q Plus (Millipore). La solució s'esterilitza per filtració (filtres Sterivex-GP Millipore de 0,22 µm) dins d'una cambra de flux vertical (Telstar, AV-100). El medi és impulsat a través del filtre amb una bomba peristàtica (Masterflex, 7521-45) amb un capçal (Masterflex, Easy-Load 7518-00)). Finalment s'hi afegeix els suplementes que es disposen en líquid i estèrils. Els medis per cultiu cel·lular disposen en la seva complexa composició de molts nutrients termosensibles, per la qual cosa mai s'esterilitzen per calor.

### 11.2.1. Medis pel cultiu de cèl·lules Vero

El medi emprat pel cultiu de les Cèl·lules Vero ha estat el Glasgow Minimum Essential Medium (G6148, Sigma).

<b>GMEM.</b>			
	(g/L)		(g/L)
Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl <sub>2</sub>	0.200	L-Arginine HCl	0.042
KCl	0.400	L-Cystine	0.0313
NaCl	6.400	L-glutamine	0.292
MgSO <sub>4</sub>	0.0001	L-histidine	0.054
Fe(NO <sub>3</sub> )·9H <sub>2</sub> O	0.350	L-isoleucine	0.0524
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1078	L-leucine	0.0524
Fonts de carboni		L-lysine·HCl	0.0731
D(+) glucose	4.500	L-methionine	0.015
Vitamines		L-phenilalanine	0.0476
Folic acid	0.002	Thiamin HCl	0.002
D-Calcium Pantothenate	0.002	L-threonine	0.0476
Choline chloride	0.002	L-tryptofan	0.008
Folic acid	0.00002	L-tyrosine	0.0522
I-inositol (myo-inositol)	0.0036	L-valine	0.0468
Niacin	0.00002		
Niacinamide	0.002	Phenol red	0.016
Pyridoxal.HCl (B6)	0.002		
Riboflavin (B2)	0.0002		
Thiamine HCl	0.002		

### 11.2.2. Medis pel cultiu per a cèl·lules Sf9.

Degut a les característiques del treball s'utilitzen quatre medis de cultiu diferents, tots dissenyats pel cultiu de cèl·lules d'insecte. Aquests medis comercials contenen sals inorgàniques, aminoàcids, vitamines i fonts de carboni necessàries pel creixement de les cèl·lules d'insecte. En la Taula 11-1 s'enumeren els diferents medis de cultiu utilitzats, especificant la seva presentació, l'empresa distribuïdora i el número de catàleg.

	<b>Presentació</b>	<b>Proveïdor</b>	<b>Nº catàleg</b>
Grace's insect cell medium	Líquid (500 ml)	Gibco	11605-045
Grace's insect cell medium	Pols	Sigma	G.9771
IPL-41 Insect medium	Pols	Sigma	I.0638
TC-100 Insect medium	Pols	Gibco	43000-017

Taula 11-1: Relació dels diferents medis de cultiu i la seva presentació per al cultiu de cèl·lules d'insecte, Sf9.

El medi líquid ja ve estèril, de manera que només s'ha de suplementar amb sèrum. El sèrum utilitzat és Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone SH30071.03 i nº de lot AJB9720), i la seva concentració varia entre un 5-0.5% depenent de l'experiment. També s'addiciona Gentamicina (antibiòtic, Sigma G-3632) a una concentració de 0,05 g/L. Degut al seu preu només s'empra en els cultius en bioreactor, on el nombre i tipus de manipulacions augmenten el risc de contaminació.

A continuació es presenten les concentracions per a l'elaboració dels diferents medis comercials que s'adquireixen en pols:

<b>Grace's insect cell medium</b>	
Grace's insect cell medium	44.53 g/L
NaHCO <sub>3</sub> (Panreac)	0.35 g/L
<b>IPL-41 Insect medium</b>	
IPL-41 Insect medium	21.68 g/L
NaHCO <sub>3</sub> (Panreac)	0.35 g/L
CaCl anhidrous (Panreac)	0.5 g/L

<hr/>	
TC-100 Insect medium	
<hr/>	
TC-100 Insect medium	19.96 g/L
NaHCO <sub>3</sub> (Panreac)	0.35 g/L
<hr/>	

Al llarg de l'experimentació del projecte, s'utilitzen medis amb i sense suplement. Un suplement vitamínic (extracte de llevat) i un altre d'aminoàcids (hidrolitzat de lactalbúmina), i han estat utilitzats en la següent concentració.

<hr/>	
Extracte de llevat (Sigma, Y-1000)	3.33 g/L
Hidrolitzat de lactalbúmina (Sigma, L-9010)	3.33 g/L
<hr/>	

**Composició dels diferents medis de cultiu.****Grace's insect cell medium, Supplemented.**

	(g/L)		(g/L)
Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl <sub>2</sub>	0.750	B-Alanine	0.255
KCl	4.100	L-Alanine	0.200
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.280	L-Arginine HCl	0.700
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.780	L-Aspartic Acid	0.350
NaHCO <sub>3</sub>	0.350	L-Asparagine	0.350
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.013	L-Cystine	0.022
Fonts de carboni		L-glutamic acid	0.600
D(-) fructose	0.400	L-glutamine	0.600
Fumaric acid	0.055	Glycine	0.650
D(+) glucose	0.700	L-histidine	2.500
Alpha-ketoglutaric acid	0.370	L-isoleucine	0.050
L(-) malic acid	0.670	L-leucine	0.075
Succinic acid	0.060	L-lysine.HCl	0.625
Sucrose	26.680	L-methionine	0.050
Vitamines		L-phenilalanine	0.150
p-aminobenzoic acid	0.00002	L-proline	0.350
D-biotin	0.00001	L-serine	0.550
D-Calcium Pantothenate	0.00002	L-threonine	0.175
Choline chloride	0.0002	L-tryptofan	0.100
Folic acid	0.00002	L-tyrosine	0.050
I-inositol (myo-inositol)	0.00002	L-valine	0.100
Niacin	0.00002	Suplements	
Nicotinic acid (B3)	0.00002	Hid. de lactalbúmina	3.330
Pyridoxine.HCl (B6)	0.00002	Extracte de llevat	3.330
Riboflavin (B2)	0.00002		
Thiamine HCl	0.00002		

<b>Grace's insect cell medium, Powdered.</b>			
	(g/L)		(g/L)
Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl <sub>2</sub>	0.750	L-Alanine	0.225
KCl	4.100	B-Alanine	0.200
MgCl <sub>2</sub>	1.070	L-Arginine HCl	0.700
MgSO <sub>4</sub>	1.368	L-Aspartic Acid	0.350
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.013	L-Asparagine	0.350
		L-Cystine·2HCl	0.027
Fonts de carboni		L-glutamic acid	0.600
Fructose	0.400	L-glutamine	0.600
fumaric acid	0.055	Glycine	0.650
D(+) glucose	0.700	L-histidine	2.500
alpha-ketoglutaric acid	0.370	L-isoleucine	0.050
L(-) malic acid	0.670	L-leucine	0.075
Maltose	1.000	L-lysine.HCl	0.625
succinic acid	0.006	L-methionine	0.050
Vitamines		L-phenilalanine	0.150
p-aminobenzoic acid	0.00002	L-proline	0.350
D-biotin	0.00001	L-serine	0.550
D-Calcium Pantothenate	0.00002	L-threonine	0.175
Choline chloride	0.00020	L-tryptofan	0.100
Folic acid	0.00002	L-Tyrosine·2Na	0.062
I-inositol (myo-inositol)	0.00002	L-valine	0.100
Niacin	0.00002		
Nicotinic acid	0.00002		
Pyridoxine.HCl (B6)	0.00002		
Riboflavin (B2)	0.00002		
Thiamine HCl	0.00002		

<b>IPL-41 Insect Cell Medium, powdered.</b>			
	(g/L)		(g/L)
Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl <sub>2</sub>	0.500	B-Alanine	0.300
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00005	L-Arginine HCl	0.800
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00055	L-Aspartic Acid	1.300
KCl	1.200	L-Asparagine	1.300
MgSO <sub>4</sub>	0.918	L-Cystine·2Na	0.13035
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.00002	L-glutamic acid	1.500
NaCl	2.850	L-glutamine	1.000
NaHCO <sub>3</sub>	0.350	Glycine	0.200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.160	L-histidine	0.200
(NH <sub>4</sub> )(MoO <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0.00004	L-Hydroxyproline	0.800
ZnCl <sub>2</sub>	0.00004	L-isoleucine	0.750
		L-leucine	0.250
Fonts de carboni		L-lysine.HCl	0.700
Fumaric acid	0.0044	L-methionine	1.000
D(+) glucose	2.500	L-phenylalanine	1.000
Alpha-ketoglutaric acid	0.0296	L-proline	0.500
L(-) malic acid	0.0536	L-serine	0.200
Maltose	1.000	L-threonine	0.200
Succinic acid	0.0048	L-tryptofan	0.100
Sucrose	1.650	L-valine	0.500
Vitamines			
p-aminobenzoic acid	0.00032		
D-biotin	0.00016		
D-Calcium Pantothenate	0.00001		
Choline chloride	0.02000		
Folic acid	0.00008		
I-inositol (myo-inositol)	0.00040		
Niacin	0.00016		
Pyridoxine.HCl (B6)	0.00040		
Riboflavin (B2)	0.00008		
Thiamine HCl	0.00008		
B12	0.00024		



<b>TC-100 insect cell medium.</b>			
	(g/L)		(g/L)
Sals inorgàniques		Aminoàcids	
CaCl <sub>2</sub>	0.980	B-Alanine	0.255
KCl	2.900	L-Arginine	0.550
MgCl <sub>2</sub>	1.070	L-Aspartic Acid	0.350
MgSO <sub>4</sub>	1.370	L-Asparagine	0.350
NaHCO <sub>3</sub>	0.350	L-Cystine	0.020
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.970	L-glutamic acid	0.600
Fonts de carboni		L-glutamine	0.600
D(+) glucose	1.000	Glycine	0.650
Tryptose Broth	2.600	L-histidine	3.400
Vitamines		L-isoleucine	0.050
p-aminobenzoic acid	0.00002	L-leucine	0.075
D-biotin	0.00001	L-lysine.HCl	0.630
D-Calcium Pantothenate	0.00011	L-methionine	0.050
Folic acid	0.00002	L-phenylalanine	0.150
I-inositol (myo-inositol)	0.00002	L-proline	0.350
Nicotinic acid (B3)	0.00002	L-serine	0.550
Pyridoxine.HCl (B6)	0.00002	L-threonine	0.180
Riboflavin (B2)	0.00002	L-tryptofan	0.100
Thiamine HCl	0.00002	L-tyrosine.2Na	0.0625
B12	0.00001	L-valine	0.100

### **11.2.3. El sèrum, suplement de medis de cultiu per cèl·lules animals.**

Entre els fluids biològics que han demostrat tenir més efectes positius per cultivar cèl·lules fora del cos es troba el sèrum. El sèrum és el medi on es troben els eritròcits i leucòcits *in vivo* i per tant no és sorprenent que sigui un suplement excel·lent en els cultius *in vitro* (Maurer-1986). Des dels principis dels cultius cel·lulars els investigadors han afegit sèrum al medi bàsic de cultiu en una concentració del 1 al 20% (v/v) per fer créixer gairebé tots els tipus cel·lulars(Shacter-1989b).

Les principals funcions del sèrum són proveir als cultius d'una sèrie de compostos amb diferents activitats que afavoreixen el creixement cel·lular a partir dels seus precursors i la producció de la proteïna d'interès(Barnes i Sato-1980). Entre aquests compostos del sèrum es destaquen :

- **Factors hormonals estimuladors del creixement i de diverses funcions cel·lulars:** La majoria d'ells es troben en concentracions de l'ordre de nanograms per ml en el sèrum. Alguns d'ells són específics per a cèl·lules en diferents estadis de diferenciació i d'altres no estan restringits a un sol tipus cel·lular.
- **Factors d'adhesió i extensió:** Moltes cèl·lules animals s'han d'adherir primer a un determinat substrat i estendre's abans que puguin començar a proliferar i formar una monocapa. Aquest adheriment a un substrat és necessari pel creixement d'algunes, però no de totes les cèl·lules cultivades *in vitro*.
- **Proteïnes de transport:** L'albumina és l'exemple més clar d'aquest tipus de proteïnes; donada la seva càrrega negativa s'uneix a àcids grassos lliures, vitamines, lípids i hormones entre d'altres, i transporta aquestes molècules entre els teixits i les cèl·lules tant *in vivo* com *in vitro*.
- **Elements traça:** El paper de varis elements traça inorgànics ha estat només parcialment estudiat però molts actuen com a cofactors d'enzims.

- El sèrum té una capacitat **tamponadora** important, bàsicament deguda a la presència d'albúmina.
- **Inhibidors específics de proteases:** Aquests protegeixen a les cèl·lules de les proteases afegides al medi per subcultivar cèl·lules adherents, així com de les proteases alliberades per la pròpia cèl·lula.
- **Agents estabilitzadors i detoxificadors del cultiu:** Alguns components del sèrum poden unir-se i detoxificar metalls pesats o compostos orgànics que es puguin trobar en el medi.
- **Protectors davant l'esforç tallant:** El sèrum proporciona proteïnes que tenen un efecte protector físic sobre les cèl·lules que creixen en suspensió davant les forces tallants (Papoutsakis·1991). L'albúmina sembla ser la principal responsable de la protecció davant les forces tallants en el cultiu, tot i que substàncies que són difícils de separar de l'albúmina també hi podrien intervenir.

A més dels components que s'han descrit a l'apartat anterior, el sèrum conté també una gran varietat de components que estan poc caracteritzats o encara no s'han identificat. Malgrat aquest gran nombre de components presents al sèrum, sembla que només molt pocs són realment essencials (Glassy *i col.*·1988).

#### 11.2.4. Medis pel cultiu de *E.coli*.

##### Medi complex LB (Luria Bertani).

És un medi de cultiu la composició del qual no es coneguda ja que utilitza extractes com de carns i llevats, però al mateix temps resulta un medi que és útil per un gran nombre de bacteris.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
Peptona	10
Extracte de llevat	5
NaCl	10
H <sub>2</sub> O ultrapura	Fins a 1 litre

Un cop dissolts els components del medi, s'ajusta el a pH = 7,4 amb NaOH (30% p/v). S'esterilitza per calor humit en un cicle de 30 minuts a 121°C.

Per a preparar plaques de cultiu amb medi sòlid s'hi afegeix 15 g/L d'agar abans d'autoclavar, i un cop estèril es deixa refredar fins a uns 50 °C abans d'addicionar els antibiòtics corresponents (ampicil·lina i kanamicina, en el cas que ens ocupa), i finalment es preparen les plaques en la cabina de flux.

### **Medi M9.**

El medi M9 és un medi mineral salí que empra la glucosa com a font de carboni, i en comparació amb el medi LB és de composició coneguda. El medi es prepara a partir de components sòlids, i alguna solució estoc per evitar precipitacions en el medi.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	1
NaCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
Glucosa	10
H <sub>2</sub> O ultrapura	Fins a 1 litre

Independentment es preparen solucions de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) i de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 M), i s'autoclava el medi base i les solucions a l'autoclau en un cicle de 30 minuts a 121°C. Una vegada s'ha esterilitzat, s'addiciona les dues solucions salines i els antibiòtics corresponents tal com s'indica en la taula.

CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	1 ml/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1 M)	1,5 ml/L

## **Medi definit MD.**

### **Medi MD per etapes en discontinu.**

El medi MD és un medi definit, però més ric que el medi mineral M9, tal i com es pot observar amb la seva composició. És un medi que s'elabora a partir de solucions concentrades estoc ja estèrils a la proporció següent:

<b>Medi MD (1 litre)</b>			
<b>Component</b>	<b>Concentració solució estoc (g/L)</b>	<b>Esterilització</b>	<b>Volum (ml)</b>
Glucosa	100	Autoclau	100
Solució Macroelements		Autoclau	688
Solució Microelements		Filtració	3
FeCl <sub>3</sub> / Citrat	5 / 6,5	Filtració	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	500	Filtració	1
Tiamina	100	Filtració	1
Ampicil·lina	100	Filtració	1
Kanamicina	25	Filtració	1
H <sub>2</sub> O ultrapura		Autoclau	200

Nota 1: tots els medis i la solució estoc de FeCl<sub>3</sub>, s'han de protegir amb paper d'alumini per tal d'evitar els efectes de la radiació lumínica.

Nota 2: les solucions d'antibiòtics i de tiamina, es guarden en alíquotes de 5 ml congelades a -20 °C.

### **Medi MD per l'etapa en discontinu alimentat.**

El medi MD per les etapes en discontinu alimentat (MDFB), és una variació del medi MD, on alguns nutrients tenen concentracions més altes i d'altres no cal addicionar-los ja que amb la concentració que hi ha en el medi MD inicial ja és suficient.

<b>Medi MDFB (500ml)</b>	
<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
Glucosa	580
Solució Microelements	78 ml
FeCl <sub>3</sub>	0,62
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11,6
Tiamina	0,4
Ampicil·lina	0,35
Kanamicina	0,09

Es pesen 300 g de glucosa i es dissolen poc a poc amb aigua ultrapura calenta ( les addicions de glucosa han de ser paulatines per evitar grumolls, i si costa de dissoldre és pot escalfar la solució al microones).

Una vegada ja està dissolta la totalitat de la glucosa, s'hi afegeix 6 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.31 g FeCl<sub>3</sub> i 39.5 ml de la solució de microelements, i una vegada s'han dissolt tots els components s'enrasa el volum fins a 500 ml i s'autoclava durant 15 minuts a 121°C en 2 recipients de 250 ml (No es pot autoclavar més temps per evitar la caramel·lització de la glucosa).

Finalment, a un volum de 250 ml de la preparació anterior, se li afegeix 5.8 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (solució estoc 475 g/L) (si en l'experiment en discontinu alimentat el pH està controlat per NH<sub>3</sub>, aquesta addició no és necessària), 900 µL de Ampicil·lina (100g/L), 900 µL Kanamicina (25g/L) i 1050 µL de Tiamina (100g/L). Totes aquestes solucions provenen de solucions estoc ja preparades i esterilitzades prèviament per filtració.

## **Solucions estoc base, i altres solucions per a les fermentacions amb medi MD.**

### **Solució estoc de Macroelements:**

Per preparar 1 l de solució de Macroelements s'ha de pesar els següents components, ajustar a pH = 7.3, i autoclavar durant 30 minuts a 121°C. Es pot guardar a temperatura ambient.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,91
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,59
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,55
NaCl	2,76
Aigua ultrapura	Fins a 1 litre

### **Solució estoc de Microelements:**

La solució estoc de microelements s'elabora pesant les concentracions descrites a la taula, i una vegada dissolts els components s'esterilitza per filtració i es tapa amb paper d'alumini per protegir-la de radiació lumínica, i es pot guardar a temperatura ambient.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.443
AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.042
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.865
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.159
CuSO <sub>4</sub>	1.546
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.009
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.418
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.008
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.020

### **Solució estoc de fosfats.**

Els fosfats s'utilitzen en les fermentacions d'alta densitat cel·lular (discontinuu alimentat), ja que no es poden afegir completament a l'inici per evitar que precipitin.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100
Aigua ultrapura	Fins a 100 ml

Es prepara una solució de 100 ml de volum, que s'autoclava durant 30 minuts a 121°C i es guarda a temperatura ambient.

### **Solució estoc d'IPTG.**

L' IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, Fluka 59740) s'usa com a inductor de les soques de *Escherichia coli* que duen el promotor *Lac*, i es preparen dues solucions estoc diferents per poder fer front a les diferents concentracions d'IPTG en les diferents sèries d'experiments.

IPTG 100 mM: Dissoldre 595,8 mg d'IPTG en 25 ml d'aigua ultrapura.

IPTG 1 M: Dissoldre 2,38 g d'IPTG en 10 ml d'aigua ultrapura.

Les solucions s'esterilitzen per filtració i es guarden al congelador de -20°C.

## **11.2.5. Medis pel cultiu de *P. pastoris*.**

### **Medi YPD.**

El medi YPD s'utilitza pel manteniment de les soques fresques per a realitzar els experiments. Aquest medi s'empra en forma sòlida en plaques Petri, que es poden emmagatzemar en al nevera durant un període de 2 mesos.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
Extracte de llevat	10
Peptona	20
Glucosa	10
Agar	20
Aigua ultrapura	Fins a 1 litre

Es dissolen els diferents components del medi en una ampolla autoclavable de 1 litre (en cas que l'agar no s'acabi de dissoldre correctament, en el procés d'autoclatatge els grumolls desapareixen), i s'esterilitza per calor humit en un autoclau durant 30 minuts a 121°C. Es deixa refredar fins a uns 50 °C, se li afegeix en cas de que sigui necessari els antibiòtics, i



en una cabina de flux es reparteix el medi a les plaques. Un cop s'han solidificat es retiren i es guarden a 4°C.

### **Medi salí base de fermentació (FBSM).**

Com s'ha explicat prèviament en l'apartat de resultats i discussió, en el cultiu de *P. Pastoris* es segueixen els protocols de preparació dels medis que Invitrogen proporciona a la web, <http://www.invitrogen.com>, i que es recull a continuació:

El medi s'elabora a partir dels elements que es mostren a la taula.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
Àcid fosfòric, (85%).	26,7 ml
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,176
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,2
MgSO <sub>4</sub>	7,28
KOH	4,13
Glicerol	40
H <sub>2</sub> O ultrapura	Fins a 1 litre

Una vegada dissolts tots els components s'ajusta el pH=5 amb NH<sub>4</sub>OH (forma d'addicionar la font de nitrogen al medi) i s'esterilitza per calor a 121°C durant 30 minuts. És un medi molt concentrat en font de carboni, fòsfor i nitrogen, pensat per suportar el creixement en discontinu fins a l'etapa de inducció.

Un cop estèril i per requeriments de la soca utilitzada, s'hi addiciona 10 ml de solució d'Histidina a una concentració de 0,4 g/L (1000x, és a dir mil vegades concentrada respecte la concentració final en el medi de cultiu).

### **Medi discontinu alimentat M-FB-1 (Glicerol).**

És el medi que s'utilitza una vegada s'han esgotat els substrats en la fase discontinua i es vol procedir a la fase discontinua alimentada, durant la fase anomenada de transició que és necessària per realitzar la transició de font de carboni.

Es prepara 1 litre d'una solució de glicerol a 100 g/L i s'autoclava durant 30 minuts a 121°C, i posteriorment s'afegeixen la resta de components:

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>	<b>Volum (ml)</b>
Glicerol	100	1000
Solució PTM1		7,5
Histidina	0,4	10

### **Medi discontinu alimentat M-FB-2 (Metanol).**

El medi M-FB-2 és el que s'utilitza per provocar la inducció en el cultiu de la *Pichia pastoris*, i la seva composició està basada en el metanol, que pot ser assimilat per l'organisme com a font de carboni. La seva composició és molt senzilla.

<b>Component</b>	<b>Volum (ml)</b>
Metanol	1000
Solució PTM1	4,4

Aquest medi si és preparat en cura no és necessari que s'esterilitzi, però no obstant i per major seguretat es pot esterilitzar per filtració amb filtres especials per solucions orgàniques. En aquest medi no s'hi addiciona Histidina, perquè en presència de metanol aquesta precipita, per tant s'afegirà directament al bioreactor.

### **Solucions concentrades estoc.**

#### **Solució de micronutrients PTM1.**

La solució de micronutrients es prepara a partir dels següents compostos, i s'esterilitza per filtració. És possible que al mesclar tots els components la solució esdevingui tèrbola i compliqui la filtració. En aquest cas es pot filtrar en dos passos, primer amb prefiltre i després amb el corresponent filtre de 0,22 µm.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
Sulfat de coure (5 H <sub>2</sub> O)	6
Nal	0,08
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3
Molibdat sòdic (2 H <sub>2</sub> O)	0,2
Àcid bòric	0,02
CoCl <sub>2</sub>	0,5
ZnCl <sub>2</sub>	20
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	65
Biotina	0,2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 ml
Aigua ultrapura	Fins a 1 litre.

La solució pot ser emmagatzemada a temperatura ambient.

### **Solució Histidina estoc 1000x.**

La solució estoc Histidina 1000x té una concentració de 0,4 g/L, s'esterilitza per filtració i es guarda en la nevera a 4°C.

### **11.2.6. Additius pel cultiu en bioreactor.**

Als cultius realitzats en bioreactor, cal afegir-hi encara alguns components més degut a les característiques d'operació, per tal de protegir les cèl·lules de les condicions d'esforç tallant que es generen degut a l'agitació mecànica, a l'aeració per bombolleig, i a la generació d'escumes. S'addiciona bàsicament antiespumant, i un protector cel·lular, plurònic, en les següents quantitats.

Antifoam C (Sigma) (Solució 1% (v/v))	5 ml
Plurònic F-68 (Sigma) (Solució 10% (p/v))	40 ml

Aquests additius s'addicionen a partir de solucions concentrades estèrils, que es preparen amb el següent protocol:

Es dissolen 25 g de Plurònic F-68 en 250 ml d'aigua ultrapura, tot i que no es dissol totalment i s'observen grumolls aquests desapareixen després de ser autoclavat. L'antiespumant es prepara a partir d'una solució ja concentrada al 30%, i es dissolen 3 ml d'antiespumant en 90 ml d'aigua ultrapura. Les dues solucions estoc s'autoclaven a 121°C durant 30 minuts.

## **11.3. Tècniques analítiques.**

### **11.3.1. Tècniques microbiològiques.**

#### **Mesura de la concentració cel·lular.**

##### **Recompte cel·lular per exclusió nuclear (cèl·lules animlas anclatge-depenents).**

En els cultius de cèl·lules anclatge-depenents, no es poden realitzar recomptes directes de concentració cel·lular, ja que donat el procés de tripsinització, les cèl·lules queden malmeses. En aquest cas es realitza una tècnica de recompte de nuclis cel·lulars.

Es pren una mostra de cultiu amb els microsuports de 1 ml, i s'introdueix en un tub de centrífuga per afavorir la seva sedimentació. Degut a la mida del microsuport, i a les cèl·lules adherides, en uns minuts ja s'ha format el pòsit.

Una vegada s'ha dipositat al fons del tub els microsuports, s'extreuen 0,8 ml del sobrenedant, i es resuspenen en 0,8 ml de PBS.

Després de deixar precipitar de nou els suports s'extreuen 0,8 ml i s'afegeix 1,8 ml d'una solució 0,1M d'àcid cítric en un 0,1% de cristall de violeta. S'homogeneïtza la mostra i s'incuba a 37°C durant 2-4 hores. Per tal d'aconseguir el desancorament i l'alliberació dels nuclis, es convenient homogeneïtzar vigorosament amb una pipeta.

Finalment es recompten els nuclis, que s'han tenyit de color violeta fosc a 100 augments mitjançant un microscopi invertit de contrast de fase (Nikon, TMS) i un

hemacitòmetre (Neubauer Improved, Brand). Es recompten els 4 camps, es descarten els dos valors extrems, i finalment s'aplica la fórmula següent:

$$[\text{cèl}/\text{mL}] = \frac{n_1 + n_2}{d \cdot V} = (n_1 + n_2) \cdot 10^4 \quad \text{Equació 11-1}$$

. On  $n_1$  i  $n_2$  són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,  $m$  és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,  $d$  és la dilució realitzada i és 0.5, i  $V$  és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de  $4 \cdot 10^{-4}$  ml.

### **Recompte cel·lular (cèl·lules animals en suspensió, Sf9).**

Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, es tenyeixen amb una mescla 1:1 d'una dissolució de blau de tripà (Sigma) diluïda al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M a pH 7.4 o NaCl 0.9% (p/v) i la mostra cel·lular.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/L)</b>
NaCl	8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,8
KCl	0,2
Aigua ultrapura	Fins a 1 litre

El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dóna un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules vives i mortes. El recompte es realitza igual que en el cas anterior, mitjançant un microscopi invertit de contrast de fase (Nikon, TMS) i un hemacitòmetre (Neubauer Improved, Brand).

Un cop realitzat el recompte cel·lular dels quatre camps que proporciona l'hemacitòmetre, es descarten els valors extrems (el més elevat i el més baix), i amb els dos valors restants es realitza la mitjana. El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent fórmula (aplicable a cèl·lules viables i mortes):

$$[\text{cèl}/\text{mL}] = \frac{n_1 + n_2}{d \cdot V} = (n_1 + n_2) \cdot 10^4$$

on  $n_1$  i  $n_2$  són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,  $m$  és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,  $d$  és la dilució amb blau de tripà realitzada i és 0.5, i  $V$  és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de  $4 \cdot 10^{-4}$  ml.

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.

$$\text{Viabilitat}(\%) = \frac{[\text{cèl viables}]}{[\text{cèl totals}]} \cdot 100$$

### **Mesura del pes sec (bacteris i llevats). Relació entre l'absorbància i el pes sec.**

La determinació del pes sec es realitza a partir de mostres d'uns 8-10 ml de volum que es filtren amb membranes de fibra de vidre (Whatman GF/F) de  $0,45 \mu\text{m}$  prèviament tarades. Es procedeix a rentar 3 vegades la mostra amb 10 ml d'aigua destil·lada, per assegurar que no hi queda restes de sals provinents del medi de cultiu. Els filtres amb les respectives mostres s'assequen en una estufa a  $100^\circ\text{C}$  durant 12 hores, i posteriorment es deixen que es refredin en un dessecador de sílica gel fins que el seu pes sigui constant. Una vegada s'ha estabilitzat la mesura del seu pes, a aquest se li descompta el pes del filtre, i es calcula el pes sec amb la següent relació:

$$PS(g/l) = \frac{(\text{Pes}_{\text{final}} - \text{Pes}_{\text{filtre}})g}{\text{Volum}_{\text{mostra}}(l)}$$

Una vegada construïdes les rectes patró (Figura 11-2), aquestes s'utilitzen per a poder determinar el pes sec a partir de la mesura d'absorbància a la corresponent longitud d'ona d'una mostra amb l'espectrofotòmetre (PU 8620 UV/VIS/NIR, Philips).

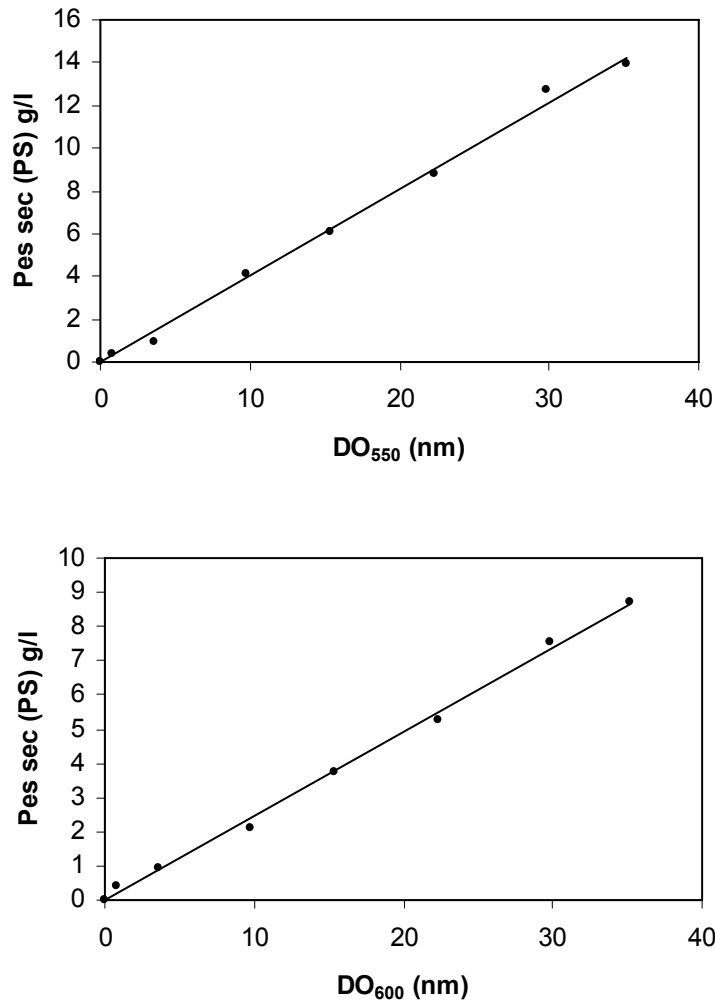


Figura 11-2: Rectes patró pel càlcul de la concentració cel·lular en cultius de bacteris i llevats. Part superior: *Escherichia coli*, amb medi MD. Part inferior: *Pichia pastoris*, amb medi FBSM.

Les equacions que s'obtenen finalment són:

$$\text{Per } E. coli: \text{ Pes sec (g/L)} = 0,4 \cdot \text{Abs}_{(550\text{nm})}$$

$$\text{Per } P. pastoris: \text{ Pes sec (g/L)} = 0,25 \cdot \text{Abs}_{(600\text{nm})}$$

## **Títolació de la concentració vírica: Baculovirus i IBDV.**

### **Baculovirus: Títolació per recompte de unitats formadores de partícules.**

L'assaig de plaques s'utilitza per a determinar la potència d'infecció d'un estoc de virus o d'una mostra d'un cultiu infectat (concentració vírica) per formació de partícules en un cultiu

de cèl·lules immobilitzades en monocapa. Aquest assaig és laboriós i llarg d'efectuar, la seva durada és aproximadament d'una setmana, i el material necessari s'exposa a continuació.

- Plaques de cultiu de 6 pous (P35, Falcon, Ref. 353046)
- Tubs de centrífuga estèrils de 15 ml de poliestirè (Orange Scientific, Vertex)
- Ampolla de vidre estèril de 100 ml
- Pipetes Pasteur estèrils
- Pipetes estèrils de 1 i 10 ml (Rubilabor)
- Bany d'aigua a 70°C
- Gel d'agarosa al 4% (Sigma)
- Roig Neutre (0.33% p/v) (Neutral red solution, N2889, Sigma)
- X-gal (Fermentas #R0401), 20 mg/mL en dimetilformamida (Merck 822275).
- Sobrenedant amb baculovirus, clarificat, lliure de cèl·lules i estèril
- Aigua ultrapura
- Cultiu de cèl·lules Sf9 a  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL
- Medi de cultiu (IPL41 + 5%FBS + Suplements) concentrat (dues vegades)

El procediment a seguir en aquest assaig es detalla pas a pas:

En condicions estèrils, es dispensen 2 ml de suspensió cel·lular ( $5 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL, o  $1 \cdot 1,5 \cdot 10^6$  cèl·lules/pou) en cada pou. Es deixa precipitar les cèl·lules al fons del pou. S'incuba, amb els pous coberts, a temperatura ambient durant 1 hora.

S'introdueix el gel d'agarosa al bany de 70°C per procedir a la seva liquació (20-30 min.), i el medi concentrat dues vegades i l'ampolla de 100 ml a 37°C.

Després d'una hora d'incubació de les plaques de cultiu, s'observa al microscopi que les cèl·lules s'han adherit i que hi ha un 50% de confluència.

Es preparen dilucions de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  del sobrenedant de virus per dilució consecutiva de 0.5 ml de la dilució prèvia en medi de cultiu sense sèrum (IPL41 + suplementes) en els tubs de 12 ml. S'ha de disposar de 8 tubs, amb 4,5 ml de solucions diluïdes, de cada solució original de virus.

Es realitza l'assaig per duplicat, de cada dilució. S'extreu el sobrenedant de cada pou. Immediatament es dispensen 200 µL de la solució de virus corresponent. S'incuba durant 1



hora a temperatura ambient, i s'agita suaument cada 15 minuts per evitar que s'assequi. Mentre s'incuben les plaques es prepara el gel d'agarosa per la immobilització dels cultius.

Preparació del gel d'agarosa, en la cabina de flux estèril:

- Es suplementa el medi amb 20 ml de sèrum i es mescla bé.
- Es mescla 25 ml d'aquest medi amb 12.5 ml d'aigua ultrapura estèril i amb 12.5 ml del gel d'agarosa al 4% liquat a l'ampolla de 100 ml.
- Es desa la solució a 37°C fins que s'utilitzi.

Després de la incubació d'una hora de les plaques de 6 pous s'extreu seqüencialment, de la solució menys concentrada a la més concentrada, el sobrenedant de l'inòcul de virus de les plaques i s'hi dispensa 2 ml de la solució d'agarosa. Aquesta operació s'ha de realitzar de forma àgil per evitar l'assecament de la monocapa. És important que la temperatura de la mescla de medi amb l'agarosa no superi la temperatura de 37°C en el moment en que s'addiciona en els pous, ja que pot provocar el desancorament de la monocapa. Es deixa endurir el gel entre 10 i 20 minuts.

S'afegeix 1 ml de medi IPL41 + 5%FBS + Suplements per sobre del gel format i s'incuben les plaques de pous a 27°C en un incubador humidificat durant 5 dies. Passats els 5 dies es retira el medi sobrant i s'afegeix 1,5 ml a cada pou de solució Roig neutre 1/40 en PBS i 100 µl de X-gal, i posteriorment s'incuba a l'estufa de 27°C durant 4-6 hores.

Preparació de la solució de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 2% (100 ml): Es dissolen 2g de X-gal en 100ml de Dimetilformamida (Usar guants i tubs de polipropilè o vidre). Els tubs s'han de cobrir amb paper d'alumini per protegir la solució de la llum. Es guarden a -20°C (No es necessari esterilitzar).

Es retira el sobrenedant i s'inverteix la placa per procedir al recompte del nombre de calbes no tenyides. El rang òptim de recompte es situa entre les 6 i les 20 calbes. El títol es pot calcular com a número d'unitats formadores de partícules (Pfu/mL) a partir de la fórmula:

$$\text{Concentració}_v \text{ (Pfu / ml)} = \frac{Nc}{Fd \cdot V_{\text{mostra}}}$$

On:

Nc = nombre de calbes recomptades en el pou.

Fd = factor de dilució de la mostra vírica.

V<sub>mostra</sub> = Volum mostra vírica diluïda afegida al pou, ml.

### **IBDV: Titulació per DICT-50.**

La titulació per DICT<sub>50</sub>, Dosi Infecciosa de Cultiu Tissular que infecta el 50% dels casos, és un paràmetre estadístic que defineix la dilució de la mostra que infectaria al 50% dels casos. Aquesta tècnica s'utilitza per a la titulació del virus IBD.

La titulació de la mostra es realitza sobre plaques Petri de 96 pous (Nunc), en les que es sembren 200 µL de cultiu de cèl·lules Vero a una densitat cel·lular de 3·10<sup>5</sup> cèl/ml. S'incuben les plaques a l'incubador a 37°C, 95% d'humitat i al 5% CO<sub>2</sub> durant 2 hores per garantir l'adhesió en monocapa.

Paral·lelament es preparen de manera estèril dilucions seriadades de la mostra vírica, en tubs falcon estèrils (Orange), amb un valor de dilució fins a dos exponents major del que s'espera calcular.

S'extreu el medi de cultiu dels pous procurant no erosionar la monocapa, i s'inoculen els pous d'una columna sencera de la placa amb 100 µL de cadascuna de les dilucions (deixant els pous dels extrems lliures per evitar evaporacions del medi), i s'addicionen 100 µL de medi fresc MEM-G al 10% de FBS.

S'incuben les plaques infectades en l'incubador de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C i 95% d'humitat durant 5 dies per garantir la totalitat de la infecció. Passats els 5 dies, es retira el sobrenedant i es tenyeixen els pous amb 100 µL de solució de cristall de violeta al 0,1% en PBS. Al cap de mitja hora es retira la solució de tinció i es recompta observant l'efecte citopàtic al microscopi invertit de contrast de fases (Nikon)

El càlcul de la DICT<sub>50</sub> s'efectua seguint el mètode de Reed and Muench, basat en definir l'exponent de la potència de 10 en la forma 10<sup>a,bc</sup>, on a és el factor de dilució més

elevat en que s'observa més d'un 50% dels pous infectats, i els decimals dels exponents  $bc$  es calculen segons la següent expressió:

$$bc = \frac{(\% \text{pous infectats major de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{pous infectats major de } 50\%) - (\% \text{pous infectats menor de } 50\%)}$$

Seguint l'exemple de la Figura 11-3, on es mostra el mètode de càlcul de l'exponent de la titulació vírica per conèixer la  $DICT_{50}$ .

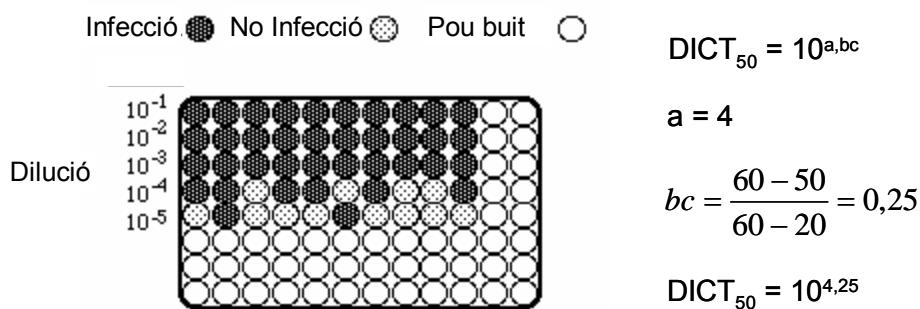


Figura 11-3: Exemple de càlcul de la  $DICT_{50}$  en un assaig hipotètic de titulació vírica, emprant el mètode de Reed Muench.

### 11.3.2. Tècniques de DNA recombinant.

#### Amplificació de DNA (PCR).

La reacció en cadena de la polimerasa, o PCR, és una tècnica que utilitza l'activitat de les DNA polimerases termostables en l'obtenció de grans quantitats de DNA (a partir de mostres que poden estar en l'ordre dels femtograms), que posteriorment es poden emprar per a la realització dels constructes per l'obtenció dels organismes recombinants que expressin les capacitats que confereix el DNA obtingut.

S'han utilitzat les polimerases Pfu (Stratagene) i iProof High Fidelity DNA Polymerase (BioRad) i es segueixen les indicacions subministrades amb els enzims pels proveïdors. A mostra d'exemple es mostra el conjunt de reactius que s'utilitzen en una PCR.

10 µl	Buffer 5x (iProof High) (Biotools)
0,5 µl	iProof High Fidelity DNA Polymerase (Biotools)
2 µl	dNTP mescla 10mM (Fermentas)
1,5 µl	Encebador directe (Fw primer)
1,5 µl	Encebador revers (Rw primer)
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)
1 µl	DNA motlle
32 µl	H <sub>2</sub> O ultrapura estèril
50 µl	Total

S'utilitza el termociclador Gene Cycler (BIORAD), i el programa dels cicles tèrmics disposa d'una base comuna per a tots els casos, del qual únicament es modifica les Th (temperatura d'hibridització), segons les seqüències dels encebadors dissenyats, partint sempre del valor de T<sub>m</sub> (Melting Point, o temperatura de fusió) menys 5°C i es disminueix el valor de temperatura fins assolir l'amplificació, i el temps d'elongació de la cadena, segons la longitud del fragment que es volia amplificar:

1 cicle	95 °C	5 minuts	Linealització DNA
30 cicles	95 °C	15 segons	Separació doble cadena.
	Th °C	30 segons	Acoblament DNA i encebador
	72 °C	30 segons	Polimerització del DNA.
1 cicle	72 °C	5 minuts	Polimerització del DNA de seguretat

És important tenir en compte que si es parteix d'una concentració de mostra massa gran, no sempre s'obté una correcta amplificació.

### **Purificació del DNA amplificat (PCR) i extracció del DNA d'un gel d'agarosa.**

Tant en les purificacions dels productes obtinguts per PCR, com en l'extracció i purificació de les bandes corresponents al material genètic d'interès separat en gels d'agarosa, s'utilitza un kit comercial QIAquick, PCR Purification Kit (Cat.No. 28104), de la casa QIAGEN. El kit està conformat tant per les diferents solucions necessàries, com per les minicolumnes i altres materials d'un sol ús necessaris. Es segueixen les instruccions proporcionades pel mateix proveïdor per realitzar les purificacions i extraccions corresponents.

### **Extracció de DNA plasmídic de les soques.**

L'extracció de DNA plasmídic de les alíquotes dels cultius de *E. coli* es realitza mitjançant un kit comercial, High Pure Plasmid kit (Roche), i s'han seguit els protocols que el propi kit proporciona. Consisteix en un kit per l'extracció de fins a 10 µg de DNA, i empra mini columnes (spin columns) per a la retenció del DNA. En cap cas s'ha hagut de manipular una excessiva quantitat de DNA i no ha estat necessari considerar kits de major capacitat.

### **Restricció enzimàtica del DNA.**

Les endonucleases de restricció són una família d'enzims que hidrolitzen la doble cadena de DNA en una regió específica que la pròpia endonucleasa és capaç de reconèixer, provocant la fragmentació de la cadena. La seqüència que es reconeix és d'entre 4-8 nucleòtids, i el tall pot ser o bé rom, o bé conferint extrems cohesius. Les condicions de treball depenen del tipus d'endonucleasa que s'utilitzi, així com el tipus de solució tampó. Un gran nombre d'enzims de restricció tenen una temperatura de treball al voltant de 37°C, però n'hi ha que requereixen temperatures diferents.

L'activitat dels enzims es descriu en unitats d'activitat (UA): una unitat correspon a la quantitat d'enzim necessari per a digerir completament 1 µg de DNA en un temps de 60 minuts, a les condicions de treball òptimes. L'activitat de les endonucleases disminueix amb la temperatura, i per preservar-la els enzims es conserven a -20°C, i es manipulen en blocs de gel per mantenir-los en fred. De manera genèrica el protocol de restricció de DNA es descriu a continuació:

<b>Component</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l)</b>
DNA	1-3
Tampó restricció 10x	1
Enzim de restricció	1 (1-5 u per $\mu$ g de DNA)
H <sub>2</sub> O ultrapura estèril	Fins a 10 $\mu$ l

S'incuba la mescla a la temperatura de treball de l'enzim durant unes 3-5 hores (es poden incubar fins a tota la nit per garantir el màxim de rendiment de la restricció).

En els casos de restriccions múltiples, s'estudia el cas en concret abans de triar la metodologia. En cas que els enzims a utilitzar emprin el mateix tampó i la mateixa temperatura, es poden addicionar conjuntament en la mescla. Si els tampons o les temperatures de treball són diferents, es recomanable realitzar la restricció per passos, i si és necessari purificant entre passos.

### **Lligació plasmidi-insert.**

La lligació de fragments de DNA és la tècnica que s'utilitza per a poder realitzar els constructes en els quals s'insereix un fragment de DNA que codifica per la proteïna d'interès dins de la seqüència d'un plasmidi. Per a realitzar al lligació s'utilitza l'enzim T4 DNA lligasa (Fermentas), que es capaç d'unir extrems ja siguin roms o cohesius de doble cadena.

La mateixa preparació de T4 DNA lligasa que s'ha utilitzat, ja duu en el kit el tampó de lligació 10x, que de la mateixa manera que la lligasa es conserva a -20°C. Per realitzar una lligació, i de forma genèrica, es procedeix a la mescla en les següents proporcions dels diferents components:

<b>Component</b>	<b>Quantitat</b>
Plasmidi	50-400 ng
Insert	3:1 respecte el vector
Tampó lligació 10x	1 $\mu$ L
T4 DNA lligasa	0,5 $\mu$ L
Aigua ultrapura autoclavada	Fins a 10 $\mu$ L

Una vegada realitzada la mescla es deixa incubant a 12 °C durant tota la nit per procedir a la lligació, i al dia següent s'inactiva la reacció mitjançant un xoc tèrmic durant 10 minuts a 65 °C.

### **Transformació de *E.coli*.**

L'electroporació és una de les metodologies de transformació bacteriana (introducció de constructes recombinants que codifiquen per la proteïna d'interès al bacteri), es basa en sotmetre l'organisme a polsos elèctrics d'alt voltatge per produir porus momentanis en la membrana plasmàtica de manera que el constructe pugui introduir-se en l'organisme. Per a poder emprar aquesta s'utilitza les anomenades cèl·lules competents, el protocol d'obtenció de les quals es descriu a continuació.

### **Preparació de cèl·lules competents.**

Es realitza un cultiu de la soca que es vol transformar en un erlenmeyer de 100 ml de volum amb medi LB (amb antibiòtic si es requereix), incubant-se a 200 rpm i 37°C fins que la DO<sub>550</sub> és aproximadament de 1 (unes 5-7 hores).

Es transvasa el cultiu en un tub falcon de polipropilè estèril i es centrifuga a 7000 rpm durant 5 minuts.

S'extreu el sobrenedant i es resuspèn el pelet en 1 ml de solució de glicerol al 10% (v/v) amb aigua ultrapura a 4°C (esterilitzada per calor humit, autoclau). Es transvasa la suspensió en un tub Eppendorf estèril, i es centrifuga a 9000 rpm durant 1 minut a 4°C.

Es repeteix l'operació de rentant amb glicerol al 10% cinc vegades per tal de garantir l'eliminació de les sals provinents del medi de cultiu, ja que interferirien en l'electroporació.

Finalment es resuspèn el pelet restant en 0,5 ml de glicerol 10%, per augmentar la concentració cel·lular i es preparen alíquotes en Eppendorfs estèrils de 50 µL de la suspensió i es guarden a -80°C.

## **Transformació per electroporació.**

En un tub de cèl·lules competents s'hi addiciona 0,5-1,5 µL de la mescla de lligació inactivada prèviament, i es deixa reposar en gel durant 1 minut.

Es transfereix la mescla en una cubeta d'electroporació neta i estèril (Electroporation cubetes plus nº 620, BTX), i s'introdueix en la cambra d'electroporació. L'electroporador (Biorad Gene Pulser II) opera en les següents condicions:  $V = 2500 \text{ v}$ ,  $C = 25 \text{ µF}$  i  $R = 200 \text{ Ω}$ .

Immediatament de la producció de la descàrrega, s'afegeix 1 ml de medi LB sense antibiòtics i s'incuba durant 1 hora a 37°C. Aquest temps d'incubació sense antibiòtic és necessari per a que s'expressi la resistència incorporada en el constructe introduït.

Finalment es sembren plaques Petri de medi LB amb els antibiòtics corresponents (marcadors de selecció) i s'incuben a una estufa a 37°C durant 18-20 hores. Les colònies que creixin són candidats de clons que han incorporat el constructe, i que caldrà a comprovar. No és aconsellable deixar incubar més les plaques per evitar l'aparició de colònies no transformades com a satèl·lits de les transformades, degut a la degradació del antibiòtic.

## **Gel de proteïnes. SDS-PAGE.**

Els gels de proteïnes es poden utilitzar per a la identificació, quantificació de proteïnes, i mitjançant després d'una transferència en una membrana de cel·lulosa per a realitzar assaigs immunològics. La tècnica consisteix en fer córrer les mostres de mescles de proteïnes a través de gels d'acrilamida sotmesos a diferencials de potencial elèctric, obtenint-se una separació de les proteïnes segons el seu pes molecular.

La separació electroforètica de proteïnes es realitza en gels desnaturalitzants de poliacrilamida al 12% i al 15% que contenen SDS, segons les mides de les bandes a separar. En la Taula 11-2 es mostren els protocols a seguir per a la preparació dels gels d'acrilamida.

El suport utilitzat per a la preparació dels gels i la separació electroforètica de les proteïnes ha estat un equip MiniProtean III (Biorad) i una font PowerPac 300 (Biorad). Normalment, les mostres de proteïnes s'han separat a voltatge constant de 150 V.



Per al reconeixement de la mida de les bandes obtingudes s'utilitzen marcadors de mida molecular coneguda (Prestained protein molecular weight marker, Fermentas). És un tipus de marcador de pes molecular que es subministra pre-tenyit, per tant permet ser transferit a les membranes de cel·lulosa per a la realització dels Westerns Blots.

Tipus de gel	Gel separador 12%	Gel separador 15%	Gel apilador
H <sub>2</sub> O	3.3 ml	2.3 ml	2.1 ml
30% acrilamida-bis	4.0 ml	5.0 ml	500 µL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	
1.5 M Tris pH 6.8			380 µL
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml	30 µL
10% persulfat d'amoni	0.1 ml	0.1 ml	30 µL
TEMED	4 µL	4 µL	3 µL

Taula 11-2: Dissolucions per a la preparació dels gels separador i empaquetador de l'electroforesi de proteïnes. Els valors mostrats estan calculats per a la preparació de 10 ml de gel separador al 12 o al 15% i de 3 ml de gel apilador.

### Preparació de les mostres pels gels de proteïnes.

Es parteix de mostres de 1 ml de cultiu (amb una densitat òptica no superior a 2), i es centrifuguen en una centrífuga de tubs Eppendorf a 9000 rpm durant 1 min, i es descarta el sobrenedant. Depenent de la mida del pelet es resuspèn en 50-100 µl d'aigua ultrapura i es congela a -20°C, per procedir a la lisi de les cèl·lules. Es descongela la mostra i s'hi afegeix la part corresponent de tampó de càrrega 2x (composició descrita a continuació), i per assegurar la total lisi es procedeix a realitzar 3 cicles de sonicació per ultrasons durant 20 segons, mantenint el vial en gel per evitar l'escalfament de la mostra.

Component	Volum (ml)
Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,8)	1,25
Glicerol	2
SDS (solució 10%)	2
β-mercaptoetanol	0,5
Blau de bromofenol (solució 1%)	0,5
Aigua Ultrapura	3,75

Si la mostra presenta una viscositat que no permet ser pipetejada amb comoditat, se li pot afegir 1 µl de solució de DNAsa (2mg/mL), i a continuació es pipeteja vigorosament.

Finalment s'incuba la mostra en una estufa a 95°C durant 5 minuts per procedir a la linealització de les proteïnes abans de ser carregades al gel. Un cop es retiren les mostres de l'estufa es mantenen en gel per evitar la seva degradació. Una vegada refredades es centrifuguen a 14000 rpm durant 5 minuts per poder carregar en el gel només el sobrenedant.

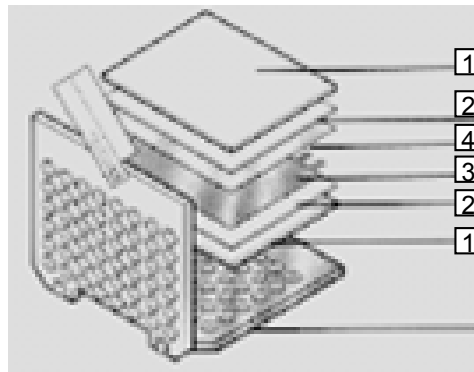
La quantitat de mostra a carregar depèn del tipus de cultiu i del que hom espera trobar com a resultat, i si el gel és per una tinció posterior o bé per realitzar un Western Blot. S'aconsella usar un volum de 3-5 µl de marcador de pes molecular, i unes mostres que oscil·lin entre 10 i 40 µl, depenent del gruix del gel d'acrilamida.

### **Assaig immunològic: Western Blot.**

La tècnica de transferència *Western* permet la detecció específica de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos, que reconeixen una regió específica de la proteïna. És una tècnica que complementa la tècnica dels gels de proteïnes, i permet assegurar que una proteïna d'una determinada mida, disposa d'una regió reconeguda específicament per un anticòs.

En primer lloc s'ha de transferir les proteïnes del gel d'acrilamida a les membranes de nitrocel·lulosa. Per això es retallen les membranes de nitrocel·lulosa de 0.45 µm (Biorad) i el paper de filtre de la mateixa mida que la del gel de proteïnes i es submergeixen conjuntament en tampó de transferència per hidratar-les i equilibrar-les.

Es munta l'anomenat sandwix de transferència com s'indica a la Figura 11-4. Es 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 situa la primera esponja, s'ubica un tros de paper de filtre i 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, la darrera esponja i es tanca el cassette.



---

Figura 11-4: Esquema del muntatge del cassette per a la transferència proteica des del gel de proteïnes a la membrana de nitrocel·lulosa, per a realitzar la tècnica del Western Blot. 1.- Esponges, 2.- Paper de filtre, 3.- Gel de proteïnes i 4.- Membrana de nitrocel·lulosa.

---

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es transfereixen a la membrana aplicant un amperatge constant de 400 mA durant 1.5 hores (PowerPac 300, Biorad), en l'interior d'una cambra freda, o introduint la cubeta en un bany amb gel.

Seguidament, es bloqueja aquesta membrana amb TBST (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, Tween 0.1%), o PBST (8g/L NaCl, 0.2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.8 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g/L KCl, Tween 0.1%) pH 7.4, amb 5% de llet en pols (Nestlé) o BSA 1% (en PBST o TBST), durant 12 hores agitant-se a 4°C.

A continuació, es renta tres vegades durant 5 minuts submergint la membrana en TBST o PBST, i s'incuba 3-5 hores amb l'anticòs monoclonal primari 14A6 (Martínez-Torrecuadrada *et al.* 2000) a una dilució 1:100-1:1000 depenent de l'anticòs en TBST o PBST.

Seguidament, es realitzen de nou tres rentats de 5 minuts en TBST o PBST, i s'incuba 1 hora amb l'anticòs secundari  $\alpha$ -IgG conjugat amb peroxidasa (a una dilució 1:1000 en TBST o PBST), que permetrà detectar les bandes per revelat quimioluminiscent.

Una vegada es realitzen els 3 rentats corresponents per netejar la membrana de les restes d'anticòs secundari conjugat amb PBST, s'asseca la membrana dipositant-la suaument sobre paper de filtre net. 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 varies exposicions de diferents temps i així veure en quin dels casos s'aconsegueix visualitzar millor les bandes en les pel·lícules autoradiogràfiques.

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, i 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 films i les dissolucions reveladora i fixadora. S'utilitzen cassettes i pel·lícules de radiografia (Amersham Life Science).

### **Quantificació de VP2 intracel·lular en cèl·lules Sf9: ELISA.**

La quantificació de la concentració de proteïna intracel·lular en cèl·lules Sf9 es realitza a partir de la tècnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Les mostres de cultiu que contenen la proteïna (mostres infectades en el cas dels cultius en Sf9), es lisen amb una solució de bicarbonat sòdic 25 mM durant 15 minuts, en un bloc de gel. Aproximadament es recomana emparar 1 ml de bicarbonat per  $2-2,5 \cdot 10^6$  cèl·lules. Posteriorment es centrifuga la mostra i s'extreu el sobrenedant per a ser analitzat per ELISA.

Anteriorment s'han preparat les plaques de ELISA (plaques de 96 pous, Nunc), immobilitzant-hi l'anticòs monoclonal que reconeix la VP2 (14A6, (Martínez-Torrecedrada *i col.* 2000) a una concentració de 1 µg/pou en tampó carbonat 0,05M a pH 9,6, incubant les plaques durant 12 hores. Posteriorment es procedeix a realitzar tres rentats amb un solució de 0,05%(v/v) de Tween-20 en PBS.

A continuació és preparen les dilucions seriades de les mostres, emprant solució de PBS amb 0,35 M NaCl i 0,05% (v/v) de Tween-20, i s'incuben les plaques durant una hora a 37°C. Posteriorment es procedeix a rentar de nou les plaques amb la solució de PBS abans esmentada i es deixen assecar uns minuts col·locant-les cap per avall.

Finalment s'hi addiciona l'anticòs monoclonal anti-IBDV conjugat amb peroxidasa 12B8 (Martínez-Torrecedrada *i col.* 2000), en una concentració 1:10000 en tampó de dilució, i s'incuben les plaques a 37°C durant 1 hora. Es renten de nou les plaques i es procedeix a la

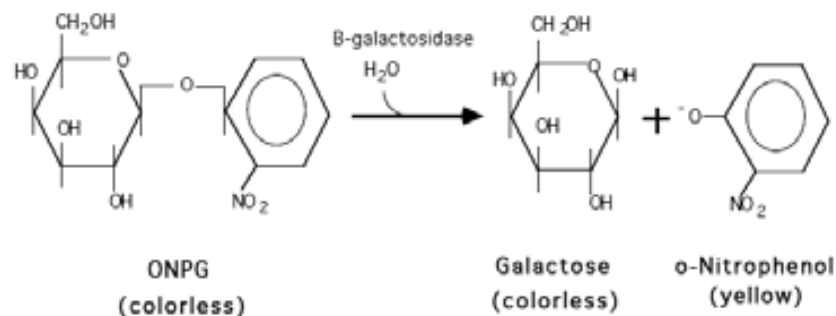
detecció de la VP2 present mitjançant l'addició de 2,2'-azinobis (3-etil-benzothiazoline-6-sufonic) (ABTS) que actua com a substrat de la reacció colorimètrica, i al cap de 10 minuts s'atura la reacció addicionant 100 µL de solució de SDS al 2%.

Les plaques es mesuren i quantifiquen en un lector de plaques d'Elisa (Bio-Tek Instruments) emprant una longitud d'ona de 405 nm. El patró per a la quantificació s'estableix per cadascuna de les anàlisis, emprant com a mostra una solució de VP2 purificada i quantificada en una columna de pous.

### **Activitat enzimàtica de β-galactosidasa. Test de Miller.**

La quantificació de l'activitat de l'enzim β-galactosidasa, es realitza a partir de mostres del cultiu en suspensió induït per temperatura entre 28°C i 42°C. Les mostres consisteixen en alíquotes de 0,2 ml del cultiu a les quals s'hi afegeix 0,1 ml de cloroform per tal de permeabilitzar les cèl·lules, junt amb 0,9 ml de Tampó Z (definit més avall) i s'agiten vigorosament amb el vòrtex cinc segons.

S'incuba la mostres durant 5 minuts en un bany a 28°C. Posteriorment s'hi afegeix el substrat de la reacció enzimàtica que consisteix en 0,2 ml de la solució de ONPG (2-nitro-fenil-β-D-galactopiranosid), a una concentració de 4 mg/mL en Tampó Fosfat, que ha de ser preparat el mateix dia. La mostra s'incuba a 28°C i es deixa reaccionar fins a l'aparició de color groc, moment en el qual s'atura la reacció amb 0.5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M.



Es mesuren les absorbàncies a 550 nm i 420 nm (PU UV/VIS/NIR sepctrophotomether, Philips), i es calcula l'activitat enzimàtica segons l'expressió següent, obtenint les unitats d'activitat per unitat de volum:

$$\frac{\text{UA}}{\text{mL}} = \frac{[\text{Abs.}_{420\text{nm}} - (1.75 \cdot \text{Abs.}_{550\text{nm}})] \cdot 1000}{V \cdot t}$$

On

**V** representa el volum de mostra processat (ml).

**t** el temps de reacció la mostra fins a l'aparició del color groc (s).

El resultat, expressat en unitats d'activitat enzimàtica/mL es pot expressar en funció de la concentració cel·lular (PS) del cultiu en el moment de prendre la mostra, s'obté l'activitat específica que s' expressa en UA/g PSC.

El Tampó Z consisteix en una mescla al 0,28 % de β-mercaptoetanol en Tampó Fosfat I, i es conserva a 4°C.

Tampó Fosfat I (pH=7)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,06 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,04 M
KCl	0,01 M
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 mM

Tampó Fosfat II (pH=7)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,06 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,04 M

### **Anàlisi enzimàtic de la glucosa i lactat.**

Les concentracions de glucosa i lactat de les mostres extretes durant els cultius es mesuren amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments).

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 i la lactat oxidases, 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. La mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per la mesura sigui filtrada o centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir la membrana.

L'analitzador pren 50 µL de cada mostra i dóna els valors de concentració de glucosa i lactat en (g/L), amb un error aproximat de ± 0.1 g/L. El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a 20.0 g/L per la glucosa i 0.05 a 2.00 g/L pel lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua ultrapura fins que les mesures entren en el rang de mesura.

L'aparell requereix una solució patró i una solució tampó, amb unes composicions que es detallen a continuació:

	<b>Component</b>	<b>Quantitat (g/L)</b>
<b>Solució patró</b>	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA	0,636
	Àcid benzoic	1,052
	Glucosa	1,8
	L-Lactat	0,45
	Aigua ultrapura	1 litre

	<b>Component</b>	<b>Quantitat (g/L)</b>
<b>Solució tampó</b>	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA	0.572
	Benzoat sòdic	0.948
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.028
	NaCl	1
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	16.2
	Sulfat de gentamicina	0.0076
	Aigua ultrapura	1 litre

Les dues solucions es filtren al buit amb una membrana d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de diàmetre de porus i s'han de renovar una vegada a la setmana.

## **Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Anàlisi de les fonts de carboni, i de metanol.**

L'anàlisi de concentració de galactosa es realitza per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), més específicament per cromatografia d'intercanvi iònic i detecció per índex de refracció.

L'equip d'anàlisi consta de les següents parts:

- cromatògraf líquid Hewlett Packard 1050 amb bomba isocràtica i injector automàtic
- detector d'índex de refracció Hewlett Packard 1047A
- integrador Hewlett Packard 3396A
- columna de bescanvi iònic Aminex HPX-87H de Bio Rad

Les condicions de l'anàlisi en les que es fa treballar el cromatògraf es detallen a continuació:

- cabal de l'eluent de 0.6 ml/min
- volum d'injecció de la mostra 20 µL
- temperatura 25°C
- temps d'anàlisi 30 minuts

La fase mòbil (eluent) és aigua ultrapura, amb el pH ajustat a 3 amb àcid sulfúric al 98%. La solució es filtra al buit a través d'una membrana de 0.45 µm i es deixa desgasificar durant 15 minuts en el mateix kitasato. A l'ampolla de l'eluent s'injecta un cabal constant d'Heli de 0,1 l/min.

Prèviament als anàlisis s'ha de posar en marxa l'equip, començant per consignar una rampa d'augment del cabal de la bomba d'eluent des de 0 fins als 0,6 ml/min. Aquest augment ha de ser progressiu per evitar la compactació de la columna. Una vegada s'assoleix el cabal desitjat, es deixa equilibrar la columna durant 30 minuts, i es defineix la línia base del cromatograma

La informació en forma de cromatograma es recull amb l'ajut d'un ordinador acoblat a l'HPLC, i l'anàlisi i quantificació dels diferents pics del cromatograma es realitzen amb el programari anomenat Millennium (Waters).



## **Anàlisi d'amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).**

Les mesures de la concentració d'amoni es realitzen a partir del kit comercial LCK 303 (Dr. Lange), que pot mesurar concentracions de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en un rang des de 2,5 fins a 60 ppm, paràmetre a tenir en compte per emprar la mostra amb la dilució corresponent. Aquest kit permet de manera senzilla i en un temps de 15 minuts de conèixer la concentració d'amoni en el cultiu.

El kit es basa en la reacció del amoni amb els ions de hipoclorit i salicilat a pH 12,6 amb presència de prussiat sòdic com a catalitzador, obtenint-se blau de indofenol, mesurant-se posteriorment la seva absorbància en un espectrofotòmetre (Dr Lange, Xion 500).

## **11.4. Sistemes de cultiu a petita escala.**

### **11.4.1. Cèl·lules animals.**

#### **Sistemes estàtics.**

Els flascons de cultiu de poliestirè que s'utilitzen ja s'adquireixen estèrils (Nunc, T-flask 136196 i 178891). S'empren dos models diferents: els de 25 cm<sup>2</sup> per cultivar volums de fins a 10 ml i els de 75 cm<sup>2</sup> per a volums de fins a 50 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 mitjançant l'intercanvi de gasos amb l'atmosfera controlada de CO<sub>2</sub> de l'incubador .

En aquests flascons s'han utilitzat bàsicament per mantenir les ressembres de la línia cel·lular, a partir de què es preparen els inòculs per als diferents experiments.

#### **Sistemes 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 la punta. Al col·locar-los sobre una placa d'agitació magnètica de velocitat

regulable (Techne, MCS-104S, amb capacitat per a 4 flascons), 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 tallant mínim per a les cèl·lules. L'agitació emprada en tots els experiments és de 50-70 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 a través d'un filtre.

Els flascons que s'utilitzen per fer créixer cultius tenen uns volums de 125 ml (ref. F-7987), 250 ml (ref. F-7690) o 500 ml (ref. F-7609) de medi. A mesura que s'augmenta el volum de cultiu, disminueix al capacitat de transferència d'oxigen, que pot afectar al creixement cel·lular.

La placa d'agitació està pensada per poder ser introduïda a l'interior del incubador 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 5% de CO<sub>2</sub> per controlar el pH en medis amb també bicarbonat.

## **11.5. Cultiu en bioreactor.**

Al llarg del treball s'utilitzen dos models diferents de bioreactors, segons el tipus de treball segons l'organisme a cultivar, i l'estratègia de monitoratge i control que es vulgui aplicar. Aquests reactors són el Biostat MCD i el Biostat Bplus ambdós de Sartorius BBI Systems.

De forma general es pot dir que el Biostat MCD (Figura 11-5) és un bioreactor més específic i configurat per a processos de cultiu cel·lular, mentre que el Biostat Bplus, està més pensat per a cultius de llevats i bacteris, tot i que qualsevol dels dos reactors pot ésser adaptat per ser emprat en qualsevol dels cultius. A més, una de les principals diferències és el programari de monitoratge i de control relacionat en cada un d'ells. El Biostat MCD duu implementat un programari específic desenvolupat prèviament per investigadors del mateix grup de recerca per a cultius cel·lulars (Casablancas·2001; Gàmez·2000), mentre que el Biostat Bplus duu incorporat el programari de gestió MCFS (programari estàndard desenvolupat pel mateix fabricant).

### 11.5.1. **Bioreactor Biostat MCD.**

El bioreactor Biostat MCD està conformat per tres blocs diferenciats, la unitat de mescla de gasos, la unitat de mesura i control (Digital Control Unit, DCU-17) i la unitat de serveis (sistemes de bombeig, de refrigeració-calefacció, etc.).



---

Figura 11-5: Imatge del Bioreactor MCD de Sartorius BBI Systems amb les quatre principals parts que el conformen. De dalt a baix: Estació mescla de gasos, Digital Unit Control, elements de bombeig i calefacció-refrigeració. Finalment a la dreta la cuba de fermentació.

---

La unitat de mesura i control digital (DCU) ofereix totes les funcions necessàries per a l'automatització del sistema, 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. A més a més, la DCU pot ser integrada en un sistema d'automatització jeràrquic via port sèrie RS-422-A, per així poder modificar o consignar amb un ordinador de gestió els paràmetres de control del procés, com es fa en aquest treball. La DCU està basada en el microprocessador de 16 bits 68010 (Motorola) i el software treballa en el sistema operatiu industrial OS-9 (Microware).

L'estació de mescla de gasos, està dotada de diferents electrovàlvules, cabalímetres màssics i d'una cambra de mescla que permeten realitzar mescles precises dels diferents gasos, que es barregen de forma diferent per controlar el pH i el  $pO_2$ . L'estació de mescla de gasos disposa d'entrades per aire, nitrogen,  $CO_2$ , i d'un gas auxiliar, normalment l'oxigen, i

permet actuar sobre cadascun dels gasos independentment, tant manual com automàticament.

A continuació, es descriuen breument els anells de control, continguts en la DCU, de les variables més importants del procés:

Control de temperatura: La temperatura es controla mitjançant un control en cascada amb un master-controlador per a la temperatura del recipient de cultiu (controlador TEMP) i un servo-controlador per a la temperatura de la camisa de termostatització del recipient (controlador JTEMP).

Control d'agitació: La velocitat d'agitació es regula a través d'un control de motor extern. La funció control de la velocitat d'agitació del sistema de la DCU treballa com un controlador de consigna. En el bioreactor la mescla s'efectua per un agitador amb tres discos de 2 grans pales d'hèlix marina inclinades a 45° i situades equidistants sobre l'eix (hi ha diferents agitadors que poden ser bescanviats).

Control de pH: En l'estació de mescla de gasos disponible, el control de pH per l'agent corrector àcid es fa amb el gas CO<sub>2</sub> (i no amb la bomba d'àcid). La bomba correctora d'àlcali i la vàlvula poden ser controlats simultàniament.

Control d'oxigen dissolt (DCU-17): Controlador *pO<sub>2</sub> Gas-Mix*: Aquesta funció de control fa funcionar directament les vàlvules d'aire i nitrogen mitjançant dues sortides pwm en operació de rang dividit. El mòdul de control sintonitzat per a la membrana tubular de silicona és un P amb banda morta i els paràmetres del controlador són: DEADB = 0.5% i XP = 4%.

Control de nivell: L'augment/disminució de nivell en el recipient de cultiu es preveu amb la funció control d'escuma (FOAM). Quan el líquid entra en contacte amb el sensor de nivell es tanca el circuit i envia un senyal digital a la funció control FOAM. Aleshores, durant un temps fixat per l'usuari, la bomba d'extracció de medi s'acciona. El controlador funciona com un *On/Off* amb temporització.

La gestió dels instruments i equips per a realitzar el monitoratge i control d'un procés necessita d'un sistema de comunicació entre l'ordinador gestor, la DCU, i la resta dels equips i sensors perifèrics (que envien un senyal de tipus elèctric proporcional al valor de la variable que es mesura).

Per a la transmissió de dades entre dos equips de control es poden emprar diferents tipus de senyals, classificables en dos grans grups: la transmissió analògica (senyal és totalment continu) i la digital (envia dades discontinuament). En aquest treball s'utilitza el protocol de comunicació RS-422-A per a les transmissions de dades des de la DCU a l'ordinador i un targeta d'adquisició de dades (Advantech PCL-812-PG) per convertir el senyal analògic a digital i el digital a analògic.

Per suportar les connexions entre la targeta d'Advantech PCL-812-PG i els diferents aparells que s'han de controlar i obtenir dades (electrovàlvules, bombes i sensors) s'utilitza una caixa de comunicacions. La caixa de comunicacions disposa de 8 entrades TTL i 8 relés (per commutar les electrovàlvules) cadascun d'ells controlats per una línia TTL de la targeta d'Advantech PCL-812-PG i està connectat a la font d'alimentació Ffreak M10-330A-03 per donar la potència necessària (6 W per a cada electrovàlvula).

LabWindows/CVI (National Instruments) és un entorn de desenvolupament de software en llenguatge de programació C. La versió utilitzada en aquest treball és LabWindows/CVI 3.0.1. Aquest es pot utilitzar per a les següents tasques:

A l'entorn de desenvolupament LabWindows/CVI es pot editar, compilar, executar i depurar programes en llenguatge ANSI C. En aquest entorn, s'utilitzen les funcions de les biblioteques de funcions de LabWindows/CVI per escriure el programa desitjat. A més, cada funció té una interfície anomenada function panel on es pot executar la funció i generar codi per cridar-la. A més a més, quan es desenvolupen programes no hi ha problemes per utilitzar mòduls objecte compilats en C, biblioteques d'execució dinàmica (DLLs), biblioteques de C, i programes de control de la instrumentació (drivers) conjuntament amb els fitxers font de ANSI C.

La força de LabWindows/CVI radica en les seves biblioteques. Les biblioteques tenen funcions per desenvolupar totes les fases del sistema d'adquisició de dades i control de la instrumentació. A més a més, dins de l'entorn de desenvolupament de LabWindows/CVI es pot accedir a una completa biblioteca d'estàndard ANSI C.

### 11.5.2. Bioreactor Biostat Bplus.

El Biostat B plus de Sartorius BBI Systems, és un equip més orientat al cultiu de bacteris i de llevats, tot i que es pot adaptar la seva configuració pel cultiu cel·lular. Com es pot observar en la Figura 11-6, i a diferència del Biostat MCD es tracta d'un equip amb una configuració més senzilla i on la DCU està integrada amb la resta d'estacions.



---

Figura 11-6: Imatge del bioreactor Biostat B plus, on es mostra la DCU integrada en un sol bloc, amb una pantalla tàctil per la consignació (a la dreta) i la cuba de fermentació amb el motor d'agitació (a l'esquerra).

---

Aquest model incorpora una pantalla tàctil que permet consignar i parametritzar els valors dels controladors i les consignes del cultiu, així com programar algunes receptes senzilles de protocols de càlcul o d'actuació, i mostrar gràficament l'evolució de les variables mesurades per les sondes.

Una altra diferència és que només disposa de dos canals independents de gasos d'entrada, i un sol de sortida, limitant molt l'ús de gasos per a la regulació de diferents

variables com pO<sub>2</sub> o pH (degut a que està orientat al cultiu de bacteris i llevats), amb els seus cabalímetres màssics.

La Unitat de Control Digital disposa de 4 bombes peristàltiques de velocitat fixa i no reversible (Matson Warlow). S'utilitzen com agents actuadors en els anells de control d'escuma i pH de la DCU. Inicialment estan assignades al control de pH (una bomba per l'àcid i una per la base), al control d'escumes (antifoam) i al control de nivell (level), no obstant es possible canviar la seva configuració i ús, i emprar-se com actuadors de control d'addició de substrats.

Els anells de control que utilitza són molt similars als que utilitza el MCD, descrits en l'apartats anteriors del mateix capítol.

El Biostat B plus incorpora la comunicació directe amb un ordinador que permet una certa programació de protocols de gestió i l'emmagatzament de les dades recollides, a través d'un programari anomenat MCFS. No obstant, és un programari que encara no ha estat del tot desenvolupat i presenta certes limitacions, com la programació de llaços consecutius. Així es pot operar directament per pantalla de la DCU o a través d'un ordinador gestor.

El fermentador Biostat B plus, s'adquireix amb el PC de gestió que incorpora el programari de gestió del mateix proveïdor, el MCFS/win. La connexió es realitza via RS-232, que es connecta des del port sèrie del PC (COM1,COM2...) al Host Port de la DCU. El programari s'executa des del mateix entorn windows. El MCFS/win es defineix com un paquet de programari de Control de supervisió i adquisició de dades aplicat a processos de fermentació que és validable per la FDA (Food and Drug agency) com a un sistema tancat de registre de dades gestionat per firmes electròniques.

El MDFS/win es pot utilitzar de tres maneres diferents: únicament com a adquisició de dades de la DCU, que comporta que les consignes d'operació s'han d'introduir a través de la pantalla tàctil. La segona forma és emprar no tan sols com a registre de dades sinó que s'utilitza per a la consignació i actuació dels controls de la DCU a nivell remot. I per últim es poden configurar protocols d'actuacions per a la realització d'estratègies de cultiu que poden estar supeditades a la informació que s'adquireix de la DCU. Això permet via l'anàlisi de variables cícliques, que es pugui procedir a una actuació quan es compleixi una condició en el cultiu prefixada (per exemple, que es comenci l'addició d'un substrat).

### **11.5.3. Equipaments dels bioreactors.**

#### **Cuba de fermentació.**

El recipient de cultiu és de vidre (borosilicat) amb una relació alçada/diàmetre de 2:1. El volum màxim de treball és de 2 litres, amb un volum total de 2,5 litres. 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.

La tapa de la cuba presenta una distribució diferent per cadascun dels bioreactors, però són semblants pel que fa a la construcció mecanitzada. Les dues disposen de entrades de 19 mm de diàmetre i entrades de 6 mm. En ella 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.

#### **Sondes bàsiques.**

El sensor de nivell està basat 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 FOAM. És un sensor que no necessita manteniment.

La sonda de pH correspon a un elèctrode de vidre i un elèctrode de referència Ag/AgCl (405-DPAS-SC-K8S/200, Mettler Toledo) esterilitzable. El seu rang de mesura oscil·la entre un pH 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 en el fermentador, o en el electròlit corresponent. Aquesta sonda té un temps de vida limitat, i després d'unes esterilitzacions (entre 10 i 20), s'ha de canviar.

La sonda de temperatura té la referència PT-100 (Sartorius BBI Systems), i el seu aspecte és d'una cànula massissa de metall. És estabilitzable i no precisa de manteniment.





---

Figura 11-7: Fotografia de les sondes bàsiques associades a tots els bioreactors, de dalt a baix: Els dos primers corresponen als sensors de nivell (un per evitar acumulació d'escumes o medi, i l'altre per marcar el nivell mínim de medi), sonda de pH, sonda de temperatura i sonda d'oxigen dissolt.

---

La sonda de  $pO_2$  és un elèctrode d'oxigen polarogràfic (32-591-3002, Ingold) esterilitzable. 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 de que la membrana es faci malbé o es ratlli. El seu manteniment consisteix en canviar l'electròlit periòdicament, i el caputxó de la membrana quan aquest s'observi danyat o la mesura no sigui habitual.

### **Sistemes d'aeració.**

Es disposa de tres sistemes per aportar oxigen en el medi de cultiu que es mostren en la Figura 11-8. Cada un dels sistemes ofereix una velocitat de transferència d'oxigen al medi diferent, però també aporta esforç tallat de manera proporcional a la capacitat de transferir oxigen.



Figura 11-8: Diferents sistemes d'aeració disponibles en els bioreactors de Sartorius BBI Systems. D'esquerra a dreta es mostren el difusor d'anell perforat, la membrana tubular de silicona i el microdifusor

- Difusor d'anell perforat: Barra d'acer inoxidable amb un anell en forma d'O al seu extrem final amb 14 orificis distribuïts uniformement de 0.5 mm de diàmetre que produeix bombolles grans. Està situat 15 mm sota l'agitador.
- 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 transporta per difusió cap al líquid del bioreactor. 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.
- Microdifusor: Barra d'acer inoxidable amb un cilindre d'acer sinteritzat a l'extrem amb nombrosos porus amb diàmetres en el rang de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Aquest s'utilitza per produir microbombolles i està situat 10 mm sota l'agitador.

El  $K_L a$  o coeficient global de transferència d'oxigen depèn de molts paràmetres com les propietats reològiques del medi de cultiu, del tipus i la velocitat d'agitació, com de la presència de deflectors entre d'altres. La peculiaritat dels diferents sistemes d'aeració és la presència o no de bombolles i la seva mida. La mida de la bombolla aporta més superfície de bescanvi d'oxigen entre fases, essent més efectiu com més petita és la bombolla, però oferint al mateix temps més esforç tallant que pot afectar al cultiu. Si s'ordena de més a menys capacitat de transmissió d'oxigen els diferents sistemes s'obté aquesta sèrie: microdifusor, difusor i

membrana de silicona. Si es realitzés la ordenació segons l'esforç tallant que es genera l'ordre es manté.

Pels 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 es canvia a usar el difusor o el microdifusor, que milloren la transferència d'oxigen però augmenten també l'esforç tallant. Per altra banda, en els cultius de bacteris i llevats, s'utilitza els difusors directament, ja que són cèl·lules més resistents. Després de cada experiment o cultiu els difusors són netejats a fons utilitzant detergent sense fosfats i aigua de qualitat Milli Q.

### **Mòdul de microfiltració CellFlo.**

El mòdul de microfiltració (Microgon CellFlo C22 M011 01N) està dissenyat per separar la fase sòlida de la fase líquida d'un cultiu (Figura 8.4). Aquests mòduls utilitzen un feix de fibres buides de gran diàmetre de porus per minimitzar l'obturament degut a l'aglomeració cel·lular. Els mòduls CellFlo poden ser esterilitzats a l'autoclau, a 121 °C durant 30 minuts.



---

Figura 11-9: Mòdul de microfiltració tangencial de fibres buides CellFlo, utilitzat en els cultius cel·lulars en perfusió.

---

El mòdul està dotat de connexions axials de 6 mm (tipus *hose barb*), connexions ràpides laterals (tipus *Female Luer Lock*). Dotat de fibres de 1 mm de diàmetre intern i un diàmetre de porus de 0,2 µm.

Aquest tipus de mòduls de microfiltració tangencial s'utilitzen pels cultius en perfusió en els sistemes de cultiu cel·lular, permetent extreure el medi de cultiu exhaurit que travessa les fibres, mentre que les cèl·lules circulen per l'interior de les fibres buides i són retornades al bioreactor.

### **Sonda Aquasant AF44CS/R.**

Aquest element permet tenir una lectura de la turbidesa del medi de cultiu on s'implementa. El sensor disposa de fibres òptiques que mesuren la llum refractada a la banda de l'infraroig (940 nm).



Figura 11-10: Sonda Aquasant AF44 CS/R amb peça adaptadora a la tapa del Biostat MCD

El sensor està fabricat en acer inoxidable i les seves dimensions són de 19 mm de diàmetre i 200 mm de llargada i duu una rosca de 22 mm que encaixa en el corresponent port mecanitzat de la tapa del reactor (Figura 11-10). És esterilitzable a l'autoclau, podent treballar a màxims de temperatura i pressió de 120 °C i 3 bars respectivament.

S'ha de tenir especial cura amb la seva manipulació, sobretot evitar que el vidre òptic del sensor rebi cap cop ni sigui ratllat, ja que la sonda quedaria inutilitzada.

La sonda ha d'anar connectada a un detector-transmissor (turbidímetre Aquasant AS82) de tractament de senyal que posteriorment és comunica amb el PC de control i monitoratge. El turbidímetre Aquasant AS82 és un transmissor que mostra la resposta de la sonda Aquasant AF 44 CS/R. Aquest transmissor disposa d'elements per poder compensar el senyal 0-20 segons (*Integration time*), així com l'ajust del senyal a zero (*Compensation*), degut

per exemple al soroll causat per les bombolles d'aire, afinar la sensibilitat del senyal, o bé canviar el guany augmentant o disminuint el rang de mesura (30/10/3/1). La sortida del senyal, que en la pantalla té un rang de 0-100 %, correspon a 4-20 mA.

## **Unitats de bombeig.**

Independentment de les unitats de bombeig incorporades als reactors (bombes peristàltiques de velocitat fixe i no reversible), al llarg del treball s'utilitzen diversos tipus de bombes. 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 Braun FE-211: Bomba de membrana dosificadora (bomba de desplaçament positiu), de velocitat variable i no reversible que disposa de diferents capçals esterilitzables en acer inoxidable. Aquests poden ser de dos tipus: F0.1 (rang de cabals 0.1-9.9 ml/min, error de dosificació inferior  $\pm 5\%$ ) i F1 (rang de cabals 1-99 ml/min, error de dosificació inferior  $\pm 2\%$ ). La bomba es connecta a la DCU del fermentador MCD per obtenir un control remot sobre ella. També pot operar manualment.

Bomba Ismatec REGLO-Analogue MS-4/8-100: Bomba peristàltica de 4 canals de velocitat variable i reversible, que permet treballar en un ampli rang de baixos cabals, depenent del diàmetre intern del tub-capçal (rang de velocitat del motor: 2-100 rpm). Pot operar manualment, o bé, remotament a través d'una interfície analògica de 0-5 V, 0-10 V, 0-20 mA o 4-20 mA.

Bomba Masterflex I/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 control remot de la velocitat és de 4-20 mA i el de l'aturada és de 5-20 V o bé 4-20 mA.

## **11.6. Bibliografia.**

Akesson, M; Hagander, P i Axelsson, JP. 2001. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology and Bioengineering*. 73:223-230.

Altaras, NE; Aunins, JG; Evans, KE; Kamen, AA; Konz, JO i Wolf, JJ. 2005. Production and formulation of adenovirus vectors. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 99:193-260.

Aucoin, M G; Perrier, M i Kamen, A. 2006. Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus ratios. *Biotechnology and Bioengineering*. 95:1081-1092.

Azad, AA; Barrett, SA i Fahey, KJ. 1985. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*. 143:35-44.

Azad, AA; Jagadish, MN; Brown, MA i Hudson, PJ. 1987. Deletion mapping and expression in *E.coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*. 161:145-152.

Bailey, JE i Ollis, DF. 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Co. New York.

Barnes, D i Sato, G. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum free medium. *Analytical Biochemistry*. 102:255-270.

Bech-Jensen, E i Carlsen, S. 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*. Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnology and Bioengineering*. 36:1-11.

Becht, H i Muller, H. 1991. Infectious bursal disease-B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. *Behring Institute Mitteilungen*:217-225.

Bedard, C; Tom, R i Kamen, A. 1993. Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnology Progress*. 9:615-624.

Behrendt, U; Koch, S; Gooch, DD; Steegmans, U i Comer, MJ. 1994. Mass spectrometry: a tool for on-line monitoring of animal cell cultures. *Cytotechnology*. 14:157-165.

Benavides, J; Mena, JA; Cisneros-Ruiz, M; Ramirez, OT; Palomares, LA. i Rito-Palomares, M. 2006. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*. 842:48-57.

Bentley, WE; Davis, RH i Kompala, DS. 1991. Dynamics of Induced cat Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 38:749-760.

Bergeron, B i Chan, P. 2004. *Biotech Industry: A global, economic and financing overview*. John Wiley and Sons Inc. New Jersey.

Bernard, AR; Lusti-Narasimhan, M; Radford, KM; Hale, RS; Seville, E i Graber, P. 1996. Downstream processing of insect cell cultures. *Cytotechnology*. 20:239-257.

Bhatia, R; Jesionowski, G; Ferrance, JP i Atai, M. 1996. Insect cell physiology. *Cytotechnology*. 20:33-41.

Bibila, TA; Ranucci, CS; Glazomitsky, K; Buckland, BC i Aunins, JG. 1994. Monoclonal antibody process development using medium concentrates. *Biotechnology Progress*. 10:87-96.

Bittner, C; Wehnert, G i Scheper, T. 1998. In situ microscopy for on-line determination of biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 60:24-35.

Blissard, GW i Rohrmann, GF. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review Entomology*. 35:127-155.

Brierley, RA; Davis, GR i Holtz, GC. 1994. Production of Insulin-Like Growth Factor-1 in Methylophilic Yeast Cells. United States Patent. 5.324.639.

Brown, SW; Meyer, HP i Fiechter, A. 1985. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23:5-9.

Campmajó, C; Cairó, JJ; Sanfeliu, A; Martinez, E; Alegret, S i Gòdia, F. 1994. Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis. *Cytotechnology*. 14:177-182.

Carrier, T; Jones, KL i Keasling, JD. 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnology and Bioengineering*. 59:666-672.

Casablanca, Antoni. 2001. *Optimització del consum de nutrients i generació de subproductes en cultius in vitro de cèl·lules animals*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Casal, I; Garcia, JL; Guisán, JM i Martínez, JM. 2000. *Biología y Salud. Serie: Biología en pocas palabras*. Sociedad Española de Biología. (<http://www.sebiot.org>). Madrid.

Cereghino, JL i Cregg, JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Review*. 24:45-66.

Clare, J. J.; Rayment, F. B.; Ballantine, S. P.; Sreekrishna, K. i Romanos, M. A. 1991. High-Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia Pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Nature Biotechnology*. 9:455-460.

Cos, Oriol. 2005a. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Cos, Oriol. 2005b. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Tesi Doctoral. Universitat autònoma de Barcelona.

Cosgrove, AS. 1962. An apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Diseases*. 6:385-389.

Cregg, JM; Tsxhopp, JF; Stillman, C; Siegel, R; Akong, M; Craig, WS; Buckholz, RG; Madden, KR; Kellaris, PA; Davis, GR i altres. 1987. High level expression and efficient assembly of the Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 5:479-485.

Deutscher, MP. 1990. Guide to protein purification. In: *Methods in Enzymology*. Abelson J i Simon M, Editors. San Diego, USA.

Dobos, P; Berthiaume, L; Leong, JA; Kibenge, KS; Muller, H i Nicholson, BL. 1995. Family *Birnaviridae*. In: *Virus taxonomy*. New York. 240-244.

Doran, PM. 1995. *Principios de la Ingenieria de los bioprocesos*. Academic Press Ltd. Sydney.

Dorresteyn, RC; Harbrink, KN; Gooljer, CD; Tramper, J i Beuvery, EC. 1996. On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:206-214.

Duboë-Laurence, P i Breger, C. 1985. *El libro del amante de la cerveza. El cuerno de la abundancia ediciones*. Palma de Mallorca.

Durany, O; Mas, C i Lopez-Santin, J. 2005. Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*. 40:707-716.

Elias, CB; Zeiser, A; Bedard, C i Kamen, AA. 2000. Enhanced growth of *Sf9* cells to a maximum density of  $5.2 \times 10^7$  cells per mL and production of beta-galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 68:381-388.

Eyer, K i Heinzle, E. 1996. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering*:277-283.

Eyer, K; Oeggerli, A i 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*. 45:54-62.



Fahey, KJ; Enry, K i Crooks, J. 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *Journal of General Virology*. 70:1473-1481.

Fahey, KJ; O'Donell, IJ i Azad, AA. 1985a. Characterization by Western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*. 66:1479-1488.

Fahey, KJ; O'Donell, IJ i Bagust, TJ. 1985b. Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity in vitro and confers protection on young chickens. *Journal of General Virology*. 66:2693-2702.

Faulkner, P i Carstens, EB. 1986. An overview of the structure and replication of baculoviruses. In: *The molecular biology of baculoviruses*; SpringerVerlag. Berlin-New York. 1-17.

Ferrance, JP; Goel, A i Atai, M. 1993. Utilization of glucose and aminoacids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnology and Bioengineering*. 54:697-707.

Finn, B.; Harvey, L. M. i McNeil, B. 2006. Near-infrared spectroscopic monitoring of biomass, glucose, ethanol and protein content in a high cell density baker's yeast fed-batch bioprocess. *Yeast*. 23:507-517.

Frahm, B.; Blank, H. C.; Cornand, P.; Oelssner, W.; Guth, U.; Lane, P.; Munack, A.; Johannsen, K. i Portner, R. 2002. Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of Biotechnology*. 99:133-148.

Francki, RIB; Fauquet, CM; Knudson, DL i Brown, F. 1991. Fifth report of the International Comité on Taxonomy of viruses. Berlin.

Freshney, RI. 1989. *Animal cell culture: a practical approach*. IRL Press. Oxford.

Fuchs, C; Koster, D; Wiebusch, S; Mahr, K; Eisbrenner, G i Markl, H. 2002. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 93:243-251.

Gàmez, X. 2000. *Estudi estratègies de cultiu per a cèl.lules d'animals, basades en eines d'instrumentació i control*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ge, X. D.; Kostov, Y. i Rao, G. 2005. Low-cost noninvasive optical CO<sub>2</sub> sensing system for fermentation and cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 89:329-334.

GEHealthcare. 2005. *Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods*. GE Healthcare.

Glassy, MC; Tharakan, JP i Chau, PC. 1988. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 32:1015-1028.

Glazer, A i Nikaido, H. 1994. *Microbial Biotechnology*; W.H. Freeman and Company. New York.

Gottschalk, G. 1979. Bacterial Metabolism. Springer-Verlag. New York.

Granados, RR i Williams, KA. 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. The Biology of Baculoviruses. CRC-Press. New Jersey.

Guan, Y; Evans, ME i Kemp, RB. 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. 58:464-477.

Guarino, LA i Summers, MD. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. Virology. 57:563-571.

Han, K; Lim, HC i Hong, J. 1992. Acetic-Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 39:663-671.

Harrison, RG; Todd, P; Rudge, SR i Petrides, DP. 2000. Bioseparations science and engineering. Handbook.

Harrison, RG; Todd, P; Rudge, SR i Petrides, DP. 2003. Bioseparations Science and Engineering. Oxford University Press. Oxford.

Henry, O; Dormond, E; Perrier, M i Kamen, A. 2004. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. Biotechnology and Bioengineering. 86:765-774.

Higareda, AE; Possani, LD i Ramirez, OT. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. Biotechnology and Bioengineering. 56:555-563.

Higgins, DR i Cregg, JM. 1998. Pichia protocols: Introduction to *Pichia pastoris*. Humana Press. New Jersey.

Hink, WF i Bezanson, DR. 1985. Invertebrate cell culture media and cell lines. In: Technology of Life Science. Ireland.

Hink, WF i Hall, RL. 1989. Recently established invertebrate cell lines. In: Cell systems applications. CRC-Press. New Jersey.

Hitchner, SB. 1970. Infectivity of Infectious Bursal Disease virus for embryonating eggs. Poultry Science. 49:511-516.

Hoffmann, F. i Rinas, U. 2000. Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Prog. 16:1000-1007.

Holms, WH. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Review. 19:85-116.

Horn, U; Strittmatter, W; Krebber, A; Knupfer, U; Kujau, M; Wenderoth, R; Muller, K; Matzku, S; Pluckthun, A i Riesenber, D. 1996. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. . Applied Microbiology and Biotechnology. 46:524-532.

Invitrogen. 2001. Pichia expression kit. Version F. Catalog no. K1710-01.

Jackwood, D. H.; Saif, Y. M. i Hughes, J. H. 1987. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. . Avian diseases. 31:370-375.

Jagadish, MN; Staton, VJ; Hudson, PJ i Azad, AA. 1988. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *E. coli* by its own virus-encoded polypeptide. Journal Virology. 62:1084-1087.

Jahic, M.; Veide, A.; Charoenrat, T.; Teeri, T. i Enfors, S. O. 2006. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress. 22:1465-1473.

Jorgensen, EB; Casablancas, A; González, G i Gòdia, F. 1997. On-line monitoring of glutamine and ammonium in mammalian-cell cultures. In: From Vaccines to Genetic Medicine; Kluwer Ac Pub. Dordrecht, The Netherlands. pp: 429-434.

Kamen, A.A.; Bédard, C.; Tom, R.; Perret, S i Jardin, B. 1996a. On-line monitoring of Respiration in Recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactors cultures. Biotechnol. Bioeng. 50:36-48.

Kamen, A.A.; Bédard, C.; Tom, R.; Perret, S i Jardin, B. 1996b. On-line monitoring of Respiration in Recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactors cultures. Biotechnology and Bioengineering. 50:36-48.

Kibenge, FSB; Dhillon, AS i Russell, RG 1988. Growth of Serotypes I and II and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Virus in *Vero* Cells. Avian Diseases. 32:298-303.

King, GA; Daugulis, AJ; Faulkner, P i Goosen, MFA. 1992. Recombinant  $\beta$ -galactosidase production in serum-free medium by insect cells in a 14-L airlift bioreactor. Biotechnology Progress. 8:567-571.

Klöppinger, M; Fertig, G; Fraune, E i Miltenburger, HG. 1990. Multistage production of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus insect cell cultures. Cytotechnology. 4:271-278.

Kobayashi, K; Kuwae, S; Ohya, T; Ohda, T; Ohyama, M i Tomomitsu, K. 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feedings strategy. Journal of Bioscience and Bioengineering. 90:280-288.

Konstantinov, KB; Pambayun, R; Matanguihan, R; Yoshida, T; Perusich, C i Hu, WS 1992. On-line monitoring of hybridoma cell growth using a laser turbidity sensor. Biotechnology and Bioengineering. 40:1337-1342.

Korz, DJ; Rinas, U; Hellmuth, K; Sanders, EA i Deckwer, WD. 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 39:59-65.

Kramer, W; Elmecker, G; Weik, R; Mattanovich, D i Bayer, K. 1996. Kinetic studies for the optimization of recombinant protein formation. *Ann NY Acad Sci*:323–333.

Kurokawa, H; Park, YS; Lijima, S i Kobayashi, T. 1994. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:95-103.

Kweon, DH; Han, NS; Park, KM i Seo, JH. 2001. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 36:537-542.

Lai, CS; Hopwood, LE i Swartz, HM. 1980. ESR studies on membrane fluidity of *Chinese hamster ovary cells* grown on microrcarriers and in suspension. *Experimental Cell Research*. 130:437-442.

Lecina, M; Soley, A; Gràcia, J; Espunya, E; Lázaro, B; Cairó, JJ i Gòdia, F. 2006. Application of on-line OUR measurements to detect actions points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 125:385-394.

Lehninger, A. L. 1975. *Biochemistry*. 2nd edition. Worth. New York.

Li, X; Feldman, S; Valle, M; Terpening, S; Clanton, D i Wu, F. 2004. Improved vaccinia virus recovery for Cell-Cultured Smallpox Vaccine (CCSV). 227<sup>th</sup> ACS National Meeting. Anaheim, United States.

Lovrecz, G i Gray, P. 1994. Use of on-line gas analysis to monitor recombinant mammalian cell cultures. *Cytotechnology*. 14:167-175.

Lueking, Angelika; Holz, Caterina; Gotthold, Christine; Lehrach, Hans i Cahill, Dolores. 2000. A System for Dual Protein Expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 20:372-378.

Macaloney, G; Draper, I; Preston, J; Anderson, KB; Rollins, MJ; Thompson, BG; Hall, JW i McNeil, B. 1996. At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Food and Bioproducts Processing*. 74:212-220.

Maiorella, B; Inlow, D; Shauger, A i Hrano, D. 1988. Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*. 6:1406-1410.

Maniatis, T; Fritsch, EF i Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Manousos, M; Ahmed, M i C, Torchio. 1980. Feasibility studies of oncornavirus production on microrcarrier cultures. *In vitro*. 16:507-515.

Martínez-Torrecuadrada, JL; Lázaro, B; Rodríguez, JF i Casal, JI. 2000. Antigenic properties and diagnostic potencial of baculovirus-expressed infectious Bursal disease virus proteins. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 7:645-651.

Maruniak, JE. 1996. Productivity of insect cells for recombinant proteins. *Cytotechnology*. 20:145-148.

Maurer. 1986. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. A Freshney, editor. IRL Press. Oxford.

Meghrou, J; Aucoin, MG; Jacob, D; Chanh, PS; Arcand, N i Kamen, A. 2005. Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a *baculovirus/insect cell* suspension culture system: From shake flasks to 20-L bioreactor. *Biotechnology Progress*. 21:154-160.

Menge, U; Fraune, E; Lehmann, J i Kula, M R. 1987. Purification of proteins from cell culture supernatants. *Developments in biological standardization*. 66 391-401.

Miller. 1997. *The Baculoviruses*. Plenum Press. New York.

Miller, DW; Safer, P i Miller, LK. 1986. An insect *baculovirus* host-vector for high-level expression of foreign genes. *Genetic Engineering*. 8:277-298.

Mitsuhashi, J. 1982. Media for insect cell cultures. *Advances in cell culture 2*. Maramorosch ed. New York.

Montagnon, BJ. 1989. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for *Vero Cell* line. *Developments in Biological Standardization*. 70:27-47.

Mundt, E; Beyer, J i Muller, H. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology*. 76:437-443.

Nakano, N; Rischke, M; Sato, S i Märkl, H. 1997. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in dialysis reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 48:597-601.

Ogawa, H.; Yamaguchi, T.; Setiyono, A.; Ho, T.; Matsuda, H.; Furusawa, S.; Fukushi, H. i Hirai, K. 1998. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Archives of Virology*. 143:2327-2341.

Ogonah, O; Shuler, ML i Granados, RR. 1991. Protein production ( $\beta$ -galactosidase) from a *baculovirus* vector in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia cells* in suspension culture. *Biotechnology Letters*. 13:265-270.

Olsson, L i Nielsen, J. 1997. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotechnology*. 15:517-522.

Omar, AR; Kim, CL; Bejo, MH i Ideris, A. 2006. Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Veterinary Science*. 7:241-247.

Ozturk, SS; Thrift, JC; Blackie, JD i Naveh, D. 1997. Real-time monitoring and control of glucose and lactate concentrations in a mammalian cell perfusion reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 53:372-378.

Pagès-Manté, A; Pujol, P; Durán, D; Fernández, F i Hernando, A. 1991. Estudios clínicos y laboratoriales de una cepa de la enfermedad de Gumboro IBD aislada en Baleares. (<http://www.hipra.com>).

Palomares, L.A. i Ramírez, O.T. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*. 22:225-237.

Papoutsakis, ET. 1991. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends in Biotechnology*. 9:316-324.

Paredes, C. 1998. Anàlisi i redistribució dels fluxes metabòlics en cèl·lules animals. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pei, WC; Hung, SY; Long, LH; Der, LT; Pei, YC i Hung, LJ. 2005. Secreted expression of the VP2 protein of very virulent infectious bursal disease virus in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*. 123:221-225.

Peters, M i Timmerhaus, K. 1991. Plant design and economics for chemical engineers. 4<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill. New York.

Peters, MA; Lin, TL i Wu, CC. 2005. Infectious bursal disease virus recovery from Vero cells transfected with RNA transcripts is enhanced by expression of the structural proteins in trans. *Archives of Virology*. 150:2183-2194.

Ranade, A. 2001. Sectoral note. Biotechnology industry. Ireland.

Rasool, Muhammad Hidayat i Hussain, Iftikhar. 2006. Preparation and evaluation of Vero-cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. *Vaccine*. 24:2810-2814.

Reuveny, S; Kim, YJ; Kemp, CW i Shiloach, J. 1993. Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied Microbiology Biotechnology*. 38:619-623.

Riesenberg, D. 1991. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology and Bioengineering*. 2:380-384.

Riesenberg, D; Schulz, V; Knorre, WA; Pohl, HD; Korz, D; Sanders, EA; Ross, A i Deckwer, WD. 1991. High Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli* at Controlled Specific Growth-Rate. *Journal of Bacteriology*. 20:17-28.

Rinas, U; Kracke-Helm, HA i Schrügerl, k. 1989. Glucose as a substrate in *Escherichia coli* recombinant strain fermentation technology. *Applied Microbiology Biotechnology*. 31:163-167.

Rong, J; Cheng, T; Liu, X; Jiang, T; Gu, H i Zou, G. 2005. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*. 23:44-51.

Sanfeliu, Anna. 1995. Producció d'antocossos monoclonals mitjançant el cultiu in vitro d'hibridomes en bioreactors: anàlisi de la fisiologia i metabolisme cel·lulars. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Schmidt, Michael; Babu, KunnelRaman; Khanna, Navin; Marten, Sabine i Rinas, Ursula. 1999. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 68:71-83.

Schopf, B; Howaldt, MW i Bailey, JE. 1990. DNA distribution and respiratory activity of *Spodoptera frugiperda* populations infected with wild-type and recombinant *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of Biotechnology*. 15:169-186.

Scorer, Carol A.; Buckholz, Richard G.; Clare, Jeffrey J. i Romanes, Michael A. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 136:111-119.

Scott, RI; Blanchard, JH i Ferguson, JR. 1992. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) insect cells. *Enzyme and microbial technology*. 14:798-804.

Seeger, Anke; Schneppe, Bernard; McCarthy, John E. G.; Deckwer, Wolf-Dieter i Rinas, Ursula. 1995. Comparison of temperature- and isopropyl-[beta]-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:947-953.

Shacter, E. 1989a. Serum-free media for bulk culture of hibridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol*. 7.

Shacter, E. 1989b. Serum-free media for bulk culture of hibridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends in Biotechnology*. 7:248-253.

Simoni, IC; Bittencourt, MJ; Marconi, R; Backx, AM; Madeira, N i Weis, C. 1999. Susceptibility of cell lines to avian viruses. *Review Microbiology*. 30:373-376.

Smith, GE; Frasier, MJ i Summers, MD. 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Virology*. 46:584-593.

Soley, A. 2002. Estudi de cultius d'hibridomaen continu amb perfusió. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Sreekrishna, K; Nelles, L; Potenz, R; Cruse, J; Mazzaferro, P; Fish, W; Fuke, M; Holden, K; Phelps, D; Wood, Pi altres. 1989. High Level Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. 28:4117-4125.

Suarez, D.C i Kilikian, B.V. 2000. Acetic acid accumulation in aerobic growth o recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemical*. 35:1051-1055.

Tsao, Y. S.; Cardoso, A. G.; Condon, R. G. G.; Voloch, M.; Lio, P.; Lagos, J. C.; Kearns, B. G. i Liu, Z. 2005. Monitoring *Chinese hamster ovary* cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 118:316-327.

Vidal, Luis. 2006. Producció de aldolasas recombinantes: de la biologia molecular al desenvolupament de processos. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal, M; Cairó, JJ; Mateu, MG i Villaverde, A. 1991. Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C1 in *E. coli*: effect on bacterial cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35:788-792.

Vila, Pau. 2001. Enginyeria metabòlica de cèl·lules d'*E.coli*. Efecte sobre el creixement, el consum de glucosa i la secreció de subproductes. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vlak, JM; Schouten, A; Usmany, M; Belsham, GJ; Klinge-Roode, EC; Maule, A; Van Lent, JW i Zuidema, D. 1990. Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology*. 178:312-320.

Volkman, LE. 1986. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. In: *The molecular biology of baculoviruses*; SpringerVerlag. Berlin. pp: 103-118.

Wang, J; Honda, H; Lenas, P; Watanabe, H i 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*. 80:107-110.

Wang, Y; Liang, ZH; Zhang, YS; Yao, SY; Hu, YG; Tang, YH; Zhu, SQ; Cui, DF i Feng, YM. 2001. Human insulin from a precursor overexpression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering*. 73:74-79.

Wilms, B; Hauck, A; Reuss, M; Sylatk, C; Mattes, R; Siemann, M i Altenbuchner, J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering*. 73:95-103.

Wilson, ME; Mainprize, TH; Friesen, PD i Miller, LK. 1987. Location, transcription and sequence of a *baculovirus* gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *Journal of Virology*. 61:661-666.

Wong, KT; Peter, CH; Greenfield, PF; Reid, S i Nielsen, LK 1996. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant *baculovirus*: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:659-666.

Wong, TK; Nielsen, LK; Greenfield, PF i Reid, S. 1994. Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of *Sf9* insect cell infected with a recombinant *baculovirus*. *Cytotechnology*. 15:157-167.

Wu, P; Ozturk, SS; Blackie, JD; Thrift, JC; Figueroa, C i Naveh, D. 1995. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 45:495-502.



Xu, Y. H.; Sun, J. J.; Mathew, G.; Jeevarajan, A. S. i Anderson, M. M. 2004. Continuous glucose monitoring and control in a rotating wall perfused bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 87:473-477.

Yasumura, Y i Kawakita, M. 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*. 21:1201-1219.

Yee, L i Blanch, HW. 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 41:781-790.

Yoon, S i Konstantinov, KB. 1994. Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:983-990.

Zanghi, JA; Schmelzer, AE; Mendoza, TP; Knop, RH i Miller, WM. 2000. Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO<sub>2</sub> or pH. *Biotechnology and Bioengineering*. 65:182 - 191.

Zeiser, A.; Elias, C. B.; Voyer, R.; Jardin, B. i Kamen, A. A. 2000. On-Line Monitoring of Physiological Parameters of Insect Cell Cultures during the Growth and Infection Process. *Biotechnology Progress*. 16:803-808.

Zhang, J; Kalogerakis, N; Behie, LA i Latrou, K. 1992. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of *baculovirus* (BmNPV). *Biotechnology and Bioengineering*. 40:1165-1172.

Zhang, W; Smith, LA; Plantz, BA; Schlegel, VL i Meagher, MM. 2002. Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. *Biotechnology Progress*. 18:1392-1399.

Zhou, W; Chen, CC; Buckland, B i Aunins, J. 1997. Fed-batch culture of recombinant NSO myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 55:783-792.

Zhou, W i Hu, WS. 1994. On-line characterization of a hybridoma cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*. 44:170-177.

**12. ANNEXES.**



## **12.1. Informació del gen VP2.**

### **12.1.1. Seqüència del gen de la VP2.**

Seqüència del gen VP2 amb els extrems amb dianes Bcl I

↓

TTCGTGATCACGATGACAAACCTGTCAGATCAAACCCAGCAGATTGTTCCGTTTCAT  
ACGGAGCCTTCTGATGCCAACACCGGACCGGCGTCCATTCCGGACGACACCCTGGAGA  
AGCACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGGACACAGGGTCAG  
GGCTAATTGTCTTTTTCCCTGGATTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTGCA  
GGGCAATGGGAACTACAACCTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCCAGAACCTACCGGCCAG  
TTACAACACTGCAGGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTTCCTCC  
TGCGCTTTATGCACTAAACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGA  
ACTGACAGATGTTAGCTACAATGGGTTGATGTCTGCAACAGCCAACATCAACGACAAAATT  
GGGAACGTCCTAGTAGGGGAAGGGGTCACCGTCCTCAGCTTACCCACATCATATGATCTT  
GGGTATGTGAGGCTTGGTGACCCCATTCGCAATAGGGCTTGACCCAAAAATGGTAGCC  
ACATGTGACAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAA  
TTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATG  
CCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGAGCTCGTGTTTCGAACAAGCGTCCACGGCCTT  
GTAAGGGCGCCACCATCTACCTCATAGGCTTTGATGGGACAACGGTAATCACCAGGGCT  
GTGGCCGCAAACAATGGGCTGACGACCGGCACCGACAACCTTATGCCATTCAATCTTGTG  
ATTCCAACAAACGAGATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCA  
AAAGTGGTGGTCAGGCAGGGGATCAGATGTCATGGTCGGCAAGAGGGAGCCTAGCAGTG  
ACGATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCCTCACGCTAGTGGCCTACGA  
AAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACGGTCGCTGGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATCC  
CAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATACGGCCGATTTGACCCAGGAGCCA  
TGAACACTACACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTCTGGC  
CAACAAGGGAGTACACTGACTTTCGTGAATACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTC  
CCCTGAAGATTGCAGGAGCATTTCGGCTTCAAAGACATAATCCGGGCCATAAGGAGGATAG  
CTGTGTGATCAGTCTC

↑

## 12.1.2. Dianes de restricció en el gen VP2.

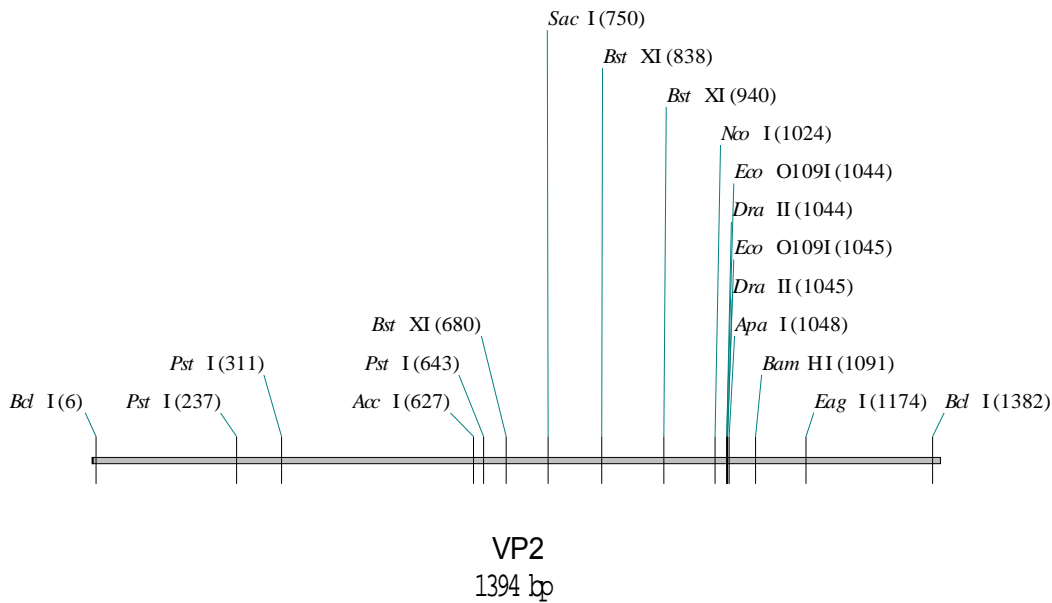
Dianes de restricció del gen VP2. Nombre de dianes (ordre alfabètic)

AatlI	0	BsaHI	2	Csp6I	3	Mlu113I	0	Sbfl	0
Acc65I	0	BsaI	1	CviAI	5	MluI	0	Scal	0
Accl	1	BsaJI	9	CviJI	34	MlyI	3	Scil	0
Acell	0	BsaWI	2	CviRI	6	MmeI	2	ScrFI	10
AcellI	1	BscAI	4	Ddel	6	MnII	14	Sell	0
Acil	2	BseMII	6	DpnI	9	MscI	1	SexAI	2
AclI	0	BseRI	0	DraI	0	MseI	0	SfaNI	4
Afel	0	BseSI	1	DraIII	0	MslI	2	Sfcl	3
AfIII	0	BsgI	0	DrdI	1	MspA1I	0	Sfil	0
AfIII	1	BsiEI	3	EaeI	5	Mwol	2	Sfol	1
Agel	0	BsiHKA1	2	EagI	1	NaeI	0	Sgfl	0
AhdI	1	BsiWI	0	EarI	0	NarI	1	SgrAI	0
AluI	5	BsII	7	Ecil	0	NciI	1	SimI	5
AlwI	5	BsmAI	3	Ecl136II	1	NcoI	1	SmaI	0
AlwNI	0	BsmBI	0	Eco57I	1	NdeI	1	SmlI	0
ApaBI	0	BsmFI	4	EcoHI	1	NgoMIV	0	SnaBI	0
Apal	1	BsmI	1	EcoNI	0	NheI	0	SpeI	0
ApaLI	0	Bsp1286I	3	EcoO109I	2	NlaIII	5	SphI	0
Apol	0	Bsp24I	1	EcoRI	0	NlaIV	10	SrfI	0
Ascl	0	BspEI	1	EcoRV	0	Nli3877I	0	Sse232I	0
Asel	0	BspHI	0	FauI	1	NotI	0	Sse8647I	0
Aval	0	BspKT6I	9	Fmul	6	Nrul	0	SspD5I	4
Avall	2	BspMI	0	Fnu4HI	2	Nsil	0	Sspl	0
AvrII	0	BsrBI	0	FokI	1	Nspl	1	Sth132I	3
Bael	0	BsrDI	1	FseI	0	PacI	0	StsI	1
BamHI	1	BsrFI	3	FspI	0	PciI	1	StuI	0
BanI	3	BsrGI	0	GdiII	4	PfIMI	0	StyI	2
BanII	2	BsrI	3	HaeI	2	PleI	3	Swal	0
Bbel	1	BssHII	0	Haell	1	PmeI	0	TalI	1
		BssKI							
Bbr7I	0	1	0	HaellI	10	PmlI	0	TaqI	4
BbsI	0	BssSI	1	Hgal	2	Ppu10I	0	TaqII	0
BbvCI	2	Bst4CI	9	Hhal	1	PpuMI	0	TatI	2
Bbvl	1	BstAPI	0	HincII	0	PshAI	1	Tfil	2
Bce83I	0	BstBI	1	HindIII	0	Psil	0	Tsel	1
Bcefl	4	BstDSI	2	Hinfl	5	PspGI	9	Tsp45I	8
Bcgl	0	BstEII	2	HinP1I	1	PspOMI	1	Tsp509I	6
BciVI	0	BstF5I	1	Hpal	0	Pssl	2	TspRI	6
BclI	2	BstNI	9	HpalI	6	PstI	3	Tth111I	0
Bfal	5	BstUI	0	HphI	4	PvuI	0	Tth111II	2
Bfil	1	BstXI	3	Hpy178III	7	PvuII	0	UnbI	6

BfrBI	0	BstYI	1	Hpy188I	6	RleAI	3	VpaK11AI	2
BglI	0	BstZ17I	0	KasI	1	RsaI	3	XbaI	0
BglII	0	Bsu36I	0	KpnI	0	RsrII	1	XcmI	0
BlnI	0	BtrI	0	LpnI	1	SacI	1	XhoI	0
BplI	0	Cac8I	1	Maell	1	SacII	0	XmaI	0
Bpml	2	Chal	9	MaellI	12	Sall	0	XmnI	0
Bpu10I	2	CjeI	5	Mbol	9	SanDI	0		
BsaAI	0	CjePI	4	MbolI	1	SapI	0		
BsaBI	0	Clal	0	Mfel	1	Sau96I	6		

### 12.1.3. Mapa de restricció del gen VP2.

A continuació es presenta el mapa de restricció de les principals dianes que s'han hagut de tenir en compte durant el treball.



## **12.2. Informes de l'avaluació econòmica.**

A continuació es recullen els informes econòmics que es generen durant les simulacions amb el programari SuperPro designer, on es poden trobar des del llistat d'equips que intervenen en cada bioprocés i els seus respectius preus (actualitzats al 2007), el cost dels operaris, la llista de matèries primeres i material fungible, els càlculs del cost d'operació, així com l'anàlisi de rendibilitat del bioprocés.

### **12.2.1. IBDV-Cèl·lules Vero.**

1.- EXECUTIVE SUMMARY (2007 prices).

Total Capital Investment	15,090,000 €
Capital Investment Charged to This Project	15,090,000 €
Operating Cost	4,909,000 €/yr
Production Rate	28,091.20 kg MP/yr
Unit Production Cost	174.75 €/kg MP
Total Revenues	6,040,000 €/yr
Gross Margin	18.72 %
Return On Investment	5.24 %
Payback Time	19.07 years
IRR (After Taxes)	9.92 %
NPV (at 7.0% Interest)	1,768,000 €

MP = Total Flow of Stream S-121

## 2.- MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2007 prices).

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	V-101	Fermentor Vessel Volume = 983.82 L	413,000	413,000
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 2.33 m2	16,000	16,000
1 / 0 / 0	MX-101	Mixer Size/Capacity = 4655.22 kg/h	1,000	1,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 777.78 L	118,000	118,000
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 18880.98 m2	95,000	95,000
1 / 0 / 0	RBR-101	Roller Bottle Rack Container Volume = 2.20 L	100,000	100,000
1 / 0 / 0	AF-101	Air Filter Rated Throughput = 112340.18 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 660515.52 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-101	Centrifugal Compressor Power = 56.21 kW	50,000	50,000
1 / 0 / 0	V-107	Blending Tank Vessel Volume = 987.85 L	122,000	122,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.36 m2	16,000	16,000
1 / 0 / 0	AF-103	Air Filter Rated Throughput = 3274.53 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 1.64 kW	47,000	47,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 50.00 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	V-102	Seed Fermentor Vessel Volume = 10.01 L	100,000	100,000
1 / 0 / 0	V-104	Fermentor Vessel Volume = 103.24 L	317,000	317,000
1 / 0 / 0	AF-105	Air Filter Rated Throughput = 13094.96 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-104	Centrifugal Compressor Power = 6.55 kW	47,000	47,000
1 / 0 / 0	AF-106	Air Filter Rated Throughput = 50.00 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	V-105	Seed Fermentor Vessel Volume = 9.79 L	100,000	100,000
1 / 0 / 0	V-106	Fermentor Vessel Volume = 103.21 L	317,000	317,000
1 / 0 / 0	RBR-102	Roller Bottle Rack Container Volume = 2.20 L	5,000	5,000
1 / 0 / 0	BC-101	Bowl Centrifuge Sigma Factor = 456.48 m2 Unlisted Equipment	71,000	71,000
			TOTAL	2,308,000



3.- FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2007 prices in €).

<b>3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)</b>	
1. Equipment Purchase Cost	2,308,000
2. Installation	944,000
3. Process Piping	808,000
4. Instrumentation	923,000
5. Insulation	69,000
6. Electrical	231,000
7. Buildings	1,039,000
8. Yard Improvement	346,000
9. Auxiliary Facilities	923,000
<b>TPDC</b>	<b>7,592,000</b>
<b>3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)</b>	
10. Engineering	1,898,000
11. Construction	2,657,000
<b>TPIC</b>	<b>4,555,000</b>
<b>3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)</b>	
<b>TPC</b>	<b>12,147,000</b>
<b>3D. Contractor's Fee &amp; Contingency (CFC)</b>	
12. Contractor's Fee	607,000
13. Contingency	1,215,000
<b>CFC = 12+13</b>	<b>1,822,000</b>
<b>3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</b>	
<b>DFC</b>	<b>13,970,000</b>

4.- LABOR COST - PROCESS SUMMARY.

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	55.20	26,558	1,465,979	100.00
<b>TOTAL</b>		<b>26,558</b>	<b>1,465,979</b>	<b>100.00</b>

## 5.- RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY.

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Cytodex3	2,500.000	116	291,060	30.08
FBS	190.000	3,210	609,834	63.03
GMEM	2.000	28,230	56,461	5.84
Air	0.080	104,585	8,367	0.86
Formol	0.600	2,593	1,556	0.16
Solució hipotòn	0.360	867	312	0.03
<b>TOTAL</b>		<b>139,602</b>	<b>967,590</b>	<b>100.00</b>

## 6.- VARIOUS CONSUMABLES COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	800.000	66 item	52,800	99.40
2.2 L Roller Bottle	4.800	66 item	317	0.60
<b>TOTAL</b>			<b>53,117</b>	<b>100.00</b>

## 7.- ANNUAL OPERATING COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Cost Item	€	%
Raw Materials	968,000	19.71
Labor-Dependent	1,466,000	29.86
Facility-Dependent	2,198,000	44.79
Laboratory/QC/QA	220,000	4.48
Consumables	53,000	1.08
Waste Treatment/Disposal	0	0.00
Utilities	4,000	0.08
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
<b>TOTAL</b>	<b>4,909,000</b>	<b>100.00</b>

8.- PROFITABILITY ANALYSIS (2007 prices).

A.	Direct Fixed Capital	13,970,000 €
B.	Working Capital	222,000 €
C.	Startup Cost	698,000 €
D.	Up-Front R&D	200,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	15,090,000 €
G.	Investment Charged to This Project	15,090,000 €
<b>H. Revenue Stream Flowrates</b>		
	Total flow in S-121	28,091 kg/yr
<b>I. Production Unit Cost</b>		
	S-121	174.75 €/kg
<b>J. Selling / Processing Price</b>		
	Total flow in S-121	215.00 €/kg
<b>K. Revenues</b>		
	S-121	6,040,000 €/yr
<b>L. Annual Operating Cost</b>		
	AOC	4,909,000 €/yr
M.	Gross Profit (K-L)	1,131,000 €/yr
N.	Taxes (30%)	339,000 €/yr
O.	Net Profit (M-N)	791,000 €/yr
	Gross Margin	18.72 %
	Return On Investment	5.24 %
	Payback Time	19.07 years

**12.2.2. Baculovirus-Sf9.**

1.- EXECUTIVE SUMMARY (2007 prices).

Total Capital Investment	11,154,000 €
Capital Investment Charged to This Project	11,154,000 €
Operating Cost	4,247,000 €/yr
Production Rate	1.49 kg MP/yr
Unit Production Cost	2,842,099.42 €/kg MP
Total Revenues	6,001,000 €/yr
Gross Margin	29.23 %
Return On Investment	11.01 %
Payback Time	9.08 years
IRR (After Taxes)	24.30 %
NPV (at 7.0% Interest)	1,375,000 €

MP = Flow of Component vp2 in Stream S-123

## 2.- MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2007 prices).

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 922.23 L	121,000	121,000
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 3.31 m <sup>2</sup>	16,000	16,000
1 / 0 / 0	V-101	Fermentor Vessel Volume = 1218.96 L	426,000	426,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 15010.71 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	BBS-101	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 20.00 L	40,000	40,000
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 8283.80 m <sup>2</sup>	71,000	71,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 155.89 L	94,000	94,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 22.99 L/h	15,000	15,000
1 / 0 / 0	DS-102	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 20.00 L/h	71,000	71,000
1 / 0 / 0	C-101	GFL Chromatography Column Column Volume = 185.08 L	268,000	268,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.08 m <sup>2</sup>	16,000	16,000
1 / 0 / 0	MX-101	Mixer Size/Capacity = 5191.95 kg/h	1,000	1,000
1 / 0 / 0	BBS-102	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 20.00 L	40,000	40,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 5140.12 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 2.57 kW	47,000	47,000
1 / 0 / 0	BBS-103	Disposable Bioreactor Skid Container Volume = 200.00 L	80,000	80,000
1 / 0 / 0	V-104	Receiver Tank Vessel Volume = 1083.52 L	32,000	32,000
		Unlisted Equipment		335,000
			<b>TOTAL</b>	<b>1,674,000</b>

3.- FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2007 prices in €).

<b>3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)</b>	
1. Equipment Purchase Cost	1,674,000
2. Installation	742,000
3. Process Piping	586,000
4. Instrumentation	670,000
5. Insulation	50,000
6. Electrical	167,000
7. Buildings	753,000
8. Yard Improvement	251,000
9. Auxiliary Facilities	670,000
<b>TPDC</b>	<b>5,563,000</b>
<b>3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)</b>	
10. Engineering	1,391,000
11. Construction	1,947,000
<b>TPIC</b>	<b>3,338,000</b>
<b>3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)</b>	
<b>TPC</b>	<b>8,901,000</b>
<b>3D. Contractor's Fee &amp; Contingency (CFC)</b>	
12. Contractor's Fee	445,000
13. Contingency	890,000
<b>CFC = 12+13</b>	<b>1,335,000</b>
<b>3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</b>	
<b>DFC</b>	<b>10,237,000</b>

4.- LABOR COST - PROCESS SUMMARY.

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	55.20	24,210	1,336,365	100.00
<b>TOTAL</b>		<b>24,210</b>	<b>1,336,365</b>	<b>100.00</b>

## 5.- RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY.

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Glucose	0.000	160	0	0.00
IPL-41 medium	9.000	43,799	394,195	43.98
ipmureses	0.000	40	0	0.00
Water	0.080	410,785	32,863	3.67
FBS	192.000	2,440	468,449	52.26
Bicarbonat 25mM	0.120	6,605	793	0.09
Air	0.000	197,392	0	0.00
<b>TOTAL</b>		<b>661,222</b>	<b>896,299</b>	<b>100.00</b>

## 6.- VARIOUS CONSUMABLES COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	800.000	96 item	76,800	39.47
Gel Filtration Resin	640.000	148 L	94,759	48.69
20 L Cell Bag	80.000	96 item	7,680	3.95
200 L Cell Bag	320.000	48 item	15,360	7.89
<b>TOTAL</b>			<b>194,599</b>	<b>100.00</b>

## 7.- ANNUAL OPERATING COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Cost Item	€	%
Raw Materials	896,000	21.10
Labor-Dependent	1,336,000	31.47
Facility-Dependent	1,601,000	37.70
Laboratory/QC/QA	200,000	4.72
Consumables	195,000	4.58
Waste Treatment/Disposal	13,000	0.31
Utilities	5,000	0.12
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
<b>TOTAL</b>	<b>4,247,000</b>	<b>100.00</b>

8.- PROFITABILITY ANALYSIS (2007 prices).

A.	Direct Fixed Capital	10,237,000 €
B.	Working Capital	205,000 €
C.	Startup Cost	512,000 €
D.	Up-Front R&D	200,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	11,154,000 €
G.	Investment Charged to This Project	11,154,000 €
<b>H. Revenue Stream Flowrates</b>		
	vp2 (in S-123)	1 kg/yr
<b>I. Production Unit Cost</b>		
	vp2 (in S-123)	2,842,099.42 €/kg
<b>J. Selling / Processing Price</b>		
	vp2 (in S-123)	4,016,064.00 €/kg
<b>K. Revenues</b>		
	S-123	6,001,000 €/yr
<b>L. Annual Operating Cost</b>		
	AOC	4,247,000 €/yr
M.	Gross Profit (K-L)	1,754,000 €/yr
N.	Taxes (30%)	526,000 €/yr
O.	Net Profit (M-N)	1,228,000 €/yr
	Gross Margin	29.23 %
	Return On Investment	11.01 %
	Payback Time	9.08 years

12.2.3. ***Pichia pastoris.***

1.- EXECUTIVE SUMMARY (2007 prices).

Total Capital Investment	10,087,000 €
Capital Investment Charged to This Project	10,087,000 €
Operating Cost	2,373,000 €/yr
Production Rate	24.92 kg MP/yr
Unit Production Cost	95,248.85 €/kg MP
Total Revenues	6,004,000 €/yr
Gross Margin	60.47 %
Return On Investment	25.20 %
Payback Time	3.97 years
IRR (After Taxes)	83.67 %
NPV (at 7.0% Interest)	13,128,000 €

MP = Flow of Component vp2 in Stream S-123

## 2.- MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2007 prices).

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 94.65 L	80,000	80,000
1 / 0 / 0	V-101	Fermentor Vessel Volume = 161.36 L	320,000	320,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 2951.68 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 1096.56 m <sup>2</sup>	71,000	71,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 210.73 L	99,000	99,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 31.61 L/h	15,000	15,000
1 / 0 / 0	DS-102	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 20.00 L/h	71,000	71,000
1 / 0 / 0	C-101	GFL Chromatography Column Column Volume = 426.19 L	280,000	280,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.04 m <sup>2</sup>	16,000	16,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 513.12 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 0.26 kW	47,000	47,000
1 / 0 / 0	V-104	Receiver Tank Vessel Volume = 143.43 L	32,000	32,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 44.44 L	70,000	70,000
1 / 0 / 0	ST-101	Heat Sterilizer Rated Throughput = 28.40 L/h	76,000	76,000
1 / 0 / 0	V-106	Fermentor Vessel Volume = 13.93 L	72,000	72,000
1 / 0 / 0	DE-101	Dead-End Filter Filter Area = 0.32 m <sup>2</sup>	16,000	16,000
		Unlisted Equipment		317,000
			<b>TOTAL</b>	<b>1,583,000</b>



3.- FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2007 prices in €).

<b>3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)</b>	
1. Equipment Purchase Cost	1,583,000
2. Installation	531,000
3. Process Piping	554,000
4. Instrumentation	633,000
5. Insulation	47,000
6. Electrical	158,000
7. Buildings	712,000
8. Yard Improvement	237,000
9. Auxiliary Facilities	633,000
<b>TPDC</b>	<b>5,090,000</b>
<b>3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)</b>	
10. Engineering	1,273,000
11. Construction	1,782,000
<b>TPIC</b>	<b>3,054,000</b>
<b>3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)</b>	
<b>TPC</b>	<b>8,145,000</b>
<b>3D. Contractor's Fee &amp; Contingency (CFC)</b>	
12. Contractor's Fee	407,000
13. Contingency	814,000
<b>CFC = 12+13</b>	<b>1,222,000</b>
<b>3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</b>	
<b>DFC</b>	<b>9,366,000</b>

4.- LABOR COST - PROCESS SUMMARY.

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	55.20	9,180	506,761	100.00
<b>TOTAL</b>		<b>9,180</b>	<b>506,761</b>	<b>100.00</b>

## 5.- RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY.

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
FBSM	1.200	6,369	7,643	13.09
Water	0.050	717,222	35,861	61.40
Tampó lisi	0.150	6,565	985	1.69
Tampó elució	0.400	23,316	9,327	15.97
Air	0.000	6,815	0	0.00
Oxygen	1.040	1,203	1,251	2.14
M_FB_2	1.600	2,086	3,338	5.72
ipmureses	0.000	0	0	0.00
<b>TOTAL</b>		<b>763,577</b>	<b>58,404</b>	<b>100.00</b>

## 6.- VARIOUS CONSUMABLES COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	800.000	132 <sub>item</sub>	105,600	41.31
Gel Filtration Resin	640.000	234 L	150,019	58.69
<b>TOTAL</b>			<b>255,619</b>	<b>100.00</b>

## 7.- ANNUAL OPERATING COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Cost Item	€	%
Raw Materials	58,000	2.46
Labor-Dependent	507,000	21.35
Facility-Dependent	1,469,000	61.90
Laboratory/QC/QA	76,000	3.20
Consumables	256,000	10.77
Waste Treatment/Disposal	7,000	0.28
Utilities	1,000	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
<b>TOTAL</b>	<b>2,373,000</b>	<b>100.00</b>

8.- PROFITABILITY ANALYSIS (2007 prices).

A.	Direct Fixed Capital	9,366,000 €
B.	Working Capital	53,000 €
C.	Startup Cost	468,000 €
D.	Up-Front R&D	200,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	10,087,000 €
G.	Investment Charged to This Project	10,087,000 €
<b>H. Revenue Stream Flowrates</b>		
	vp2 (in S-123)	25 kg/yr
<b>I. Production Unit Cost</b>		
	vp2 (in S-123)	95,248.85 €/kg
<b>J. Selling / Processing Price</b>		
	vp2 (in S-123)	240,963.00 €/kg
<b>K. Revenues</b>		
	S-123	6,004,000 €/yr
<b>L. Annual Operating Cost</b>		
	AOC	2,373,000 €/yr
M.	Gross Profit (K-L)	3,631,000 €/yr
N.	Taxes (30%)	1,089,000 €/yr
O.	Net Profit (M-N)	2,542,000 €/yr
	Gross Margin	60.47 %
	Return On Investment	25.20 %
	Payback Time	3.97 years

12.2.4. *Escherichia coli.*

1.- EXECUTIVE SUMMARY (2007 prices).

Total Capital Investment	11,238,000 €
Capital Investment Charged to This Project	11,238,000 €
Operating Cost	3,665,000 €/yr
Production Rate	4,061.77 kg MP/yr
Unit Production Cost	902.28 €/kg MP
Total Revenues	6,011,000 €/yr
Gross Margin	39.03 %
Return On Investment	14.61 %
Payback Time	6.84 years
IRR (After Taxes)	42.73 %
NPV (at 7.0% Interest)	4,914,000 €

MP = Total Flow of Stream S-123

## 2.- MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2007 prices).

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (€)	Cost (€)
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 144.45 L	94,000	94,000
1 / 0 / 0	V-101	Fermentor Vessel Volume = 283.61 L	347,000	347,000
1 / 0 / 0	AF-102	Air Filter Rated Throughput = 7087.33 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	DS-101	Disk-Stack Centrifuge Sigma Factor = 1921.30 m <sup>2</sup>	71,000	71,000
1 / 0 / 0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 243.88 L	101,000	101,000
1 / 0 / 0	HG-101	Homogenizer Rated Throughput = 36.58 L/h	15,000	15,000
1 / 0 / 0	DS-102	Disk-Stack Centrifuge Throughput = 20.00 L/h	71,000	71,000
1 / 0 / 0	C-101	GFL Chromatography Column Column Volume = 302.86 L	307,000	307,000
1 / 0 / 0	DE-102	Dead-End Filter Filter Area = 0.04 m <sup>2</sup>	16,000	16,000
1 / 0 / 0	AF-104	Air Filter Rated Throughput = 1204.63 L/h	5,000	5,000
1 / 0 / 0	G-102	Centrifugal Compressor Power = 0.60 kW	47,000	47,000
1 / 0 / 0	V-104	Receiver Tank Vessel Volume = 251.31 L	32,000	32,000
1 / 0 / 0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 94.45 L	75,000	75,000
1 / 0 / 0	ST-101	Heat Sterilizer Rated Throughput = 32.50 L/h	76,000	76,000
1 / 0 / 0	ST-102	Heat Sterilizer Rated Throughput = 21.25 L/h	76,000	76,000
1 / 0 / 0	MX-101	Mixer Size/Capacity = 507.90 kg/h	1,000	1,000
1 / 0 / 0	V-106	Fermentor Vessel Volume = 13.81 L	72,000	72,000
		Unlisted Equipment		351,000
			<b>TOTAL</b>	<b>1,753,000</b>

3.- FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2007 prices in €).

<b>3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)</b>	
1. Equipment Purchase Cost	1,753,000
2. Installation	594,000
3. Process Piping	614,000
4. Instrumentation	701,000
5. Insulation	53,000
6. Electrical	175,000
7. Buildings	789,000
8. Yard Improvement	263,000
9. Auxiliary Facilities	701,000
<b>TPDC</b>	<b>5,642,000</b>
<b>3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)</b>	
10. Engineering	1,411,000
11. Construction	1,975,000
<b>TPIC</b>	<b>3,385,000</b>
<b>3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)</b>	
<b>TPC</b>	<b>9,028,000</b>
<b>3D. Contractor's Fee &amp; Contingency (CFC)</b>	
12. Contractor's Fee	451,000
13. Contingency	903,000
<b>CFC = 12+13</b>	<b>1,354,000</b>
<b>3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)</b>	
<b>DFC</b>	<b>10,382,000</b>

4.- LABOR COST - PROCESS SUMMARY.

Labor Type	Unit Cost (€/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (€)	%
Operator	55.20	20,177	1,113,772	100.00
<b>TOTAL</b>		<b>20,177</b>	<b>1,113,772</b>	<b>100.00</b>

## 5.- RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY.

Bulk Raw Material	Unit Cost (€/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (€)	%
Medi MD	0.720	18,794	13,532	3.55
Water	0.050	1,273,618	63,681	16.71
Tampó lisi	0.150	15,995	2,399	0.63
Tampó elució	0.400	40,368	16,147	4.24
Air	0.000	32,483	0	0.00
Oxygen	1.040	5,732	5,962	1.56
Medi MD FB	1.600	11,330	18,127	4.76
IPTG	19,500.000	13	261,300	68.56
<b>TOTAL</b>		<b>1,398,333</b>	<b>381,148</b>	<b>100.00</b>

## 6.- VARIOUS CONSUMABLES COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Consumable	Units Cost (€)	Annual Amount	Annual Cost (€)	%
Dft DEF Cartridge	800.000	134 <sub>item</sub>	107,200	29.22
Gel Filtration Resin	640.000	406 L	259,732	70.78
<b>TOTAL</b>			<b>366,932</b>	<b>100.00</b>

## 7.- ANNUAL OPERATING COST (2007 prices) - PROCESS SUMMARY.

Cost Item	€	%
Raw Materials	381,000	10.40
Labor-Dependent	1,114,000	30.39
Facility-Dependent	1,628,000	44.43
Laboratory/QC/QA	167,000	4.56
Consumables	367,000	10.01
Waste Treatment/Disposal	5,000	0.15
Utilities	2,000	0.06
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
<b>TOTAL</b>	<b>3,665,000</b>	<b>100.00</b>

8.- PROFITABILITY ANALYSIS (2007 prices).

A.	Direct Fixed Capital	10,382,000 €
B.	Working Capital	137,000 €
C.	Startup Cost	519,000 €
D.	Up-Front R&D	200,000 €
E.	Up-Front Royalties	0 €
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	11,238,000 €
G.	Investment Charged to This Project	11,238,000 €
<b>H. Revenue Stream Flowrates</b>		
	Total flow in S-123	4,062 kg/yr
<b>I. Production Unit Cost</b>		
	S-123	902.28 €/kg
<b>J. Selling / Processing Price</b>		
	Total flow in S-123	1,479.95 €/kg
<b>K. Revenues</b>		
	S-123	6,011,000 €/yr
<b>L. Annual Operating Cost</b>		
	AOC	3,665,000 €/yr
M.	Gross Profit (K-L)	2,346,000 €/yr
N.	Taxes (30%)	704,000 €/yr
O.	Net Profit (M-N)	1,642,000 €/yr
	Gross Margin	39.03 %
	Return On Investment	14.61 %
	Payback Time	6.84 years

### 12.3. L'embrió del treball.

