



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO DEL CULTIVO EN PERFUSIÓN DE CÉLULAS PK15 PARA LA PRODUCCIÓN
DE VACUNAS VETERINARIAS Y ANÁLISIS DE PUNTOS CRÍTICOS PARA SU
ESCALAMIENTO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

FELIPE IGNACIO VÉLIZ VALENZUELA

PROFESORA GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
IVÁN VALDÉS VALDIVIA

Esta memoria ha sido financiada por:
Veterquímica ICDBVQ15
ANID Fondef ID18I10308

SANTIAGO DE CHILE
2020

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: FELIPE IGNACIO VÉLIZ VALENZUELA
FECHA: 2020
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

ESTUDIO DEL CULTIVO EN PERFUSIÓN DE CÉLULAS PK15 PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS VETERINARIAS Y ANÁLISIS DE PUNTOS CRÍTICOS PARA SU ESCALAMIENTO

El síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PWMD) es una enfermedad que afecta a los cerdos y es causada por el circovirus porcino (PCV2). El objetivo de este trabajo es mejorar la productividad de biomasa y antígeno viral de un proceso de producción de vacunas contra PCV2 en la línea celular PK15, así como analizar los puntos más relevantes para trasladar los resultados a una escala de planta piloto.

Para la mejora en la producción de biomasa, se realizaron pruebas en pseudoperfusión y se utilizaron las mediciones de metabolitos de dichos experimentos para proponer un diseño de alimentación racional para los cultivos. Por otro lado, para la mejora en la productividad de antígeno, se probaron modificaciones al protocolo de infección, incluyendo el uso de hipotermia moderada, la incubación con concanavalina A y la infección de un cultivo de alta densidad.

Utilizando pseudoperfusión con cambio total de medio diario se logra una densidad celular máxima de $10 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Al utilizar la alimentación concentrada diseñada a partir de este experimento, se puede disminuir la tasa de perfusión a solo un 10 % del volumen total, alcanzando valores similares de densidad celular.

Por otro lado, la utilización de hipotermia moderada y preincubación con concanavalina A muestran mejoras de 3,2 y 2,4 veces en la productividad de PCV2 en cultivo, respectivamente. La infección en alta densidad tiene una productividad específica de solo la mitad con respecto al caso original, aunque esto se compensa si se considera el número de células totales.

Finalmente, se propone un tren de inoculación y un protocolo de infección para el proceso en biorreactores, así como la instrumentación y control requeridos por los equipos. También se estimaron la agitación y aireación requerida mediante correlaciones y balances.

A partir del trabajo realizado se logró aumentar la productividad de biomasa y antígeno viral de los cultivos, y se propuso una estrategia para su traslado a una escala de planta piloto, donde se podrán realizar pruebas finales antes de la implementación del proceso.

Agradecimientos

Quiero partir por agradecerle a mi abuelita, Grimaldina Olivares, quién ha sido el pilar fundamental de mi vida y de toda nuestra familia. Nada de esto sería posible sin su amor, sin su dedicación y sin su apoyo incondicional. Cada cosa que he logrado en mi vida es gracias a ella.

También quiero agradecerle a mi mamá, Sandra Valenzuela, por siempre ser un ejemplo a seguir y por ayudarme en cada etapa de mi vida. Y al resto de mi familia, mis tíos y tías, mis abuelitos, mis primos y primas, que siempre han estado ahí en los momentos en que los he necesitado.

A Sebastián Aguilera quiero agradecerle por todo lo que hemos vivido en este tiempo. El futuro puede ser complicado, y solo me queda decirte que has logrado que este haya sido el período más feliz de mi vida.

A mi profesora Ziomara Gerdtzen, por mostrarme el mundo de los cultivos de células mamíferas, por dejarme explorar, equivocarme, crecer y desarrollar mis habilidades. También al grupo del Laboratorio de Cultivo de Células Mamíferas, quienes siempre tuvieron disposición para ayudarme con este proyecto. Agradecimientos especiales a Gerardo Flores y Felipe Sánchez, cuyos resultados son parte de esta memoria.

A Veterquímica S.A. por confiar en la Universidad y en nuestro laboratorio para desarrollar este proyecto. En particular, quiero agradecer a Kurt Pohlhammer por sus resultados previos y por ayudarme con las mediciones de equivalentes virales en su laboratorio.

Quiero agradecer a mis amigos, ya que sin ellos no podría haber llegado tan lejos. A Lorna León, Josefa Orellana, Daniel Levet, Benjamín Parraguez, Daniela Dueñas y Rodrigo Quezada por mostrarme todas las formas en que alguien se puede convertir en un gran ingeniero y en una gran persona. A Karen Rojas, Manuel Pincheira, Daniel Espinoza, Felipe Jorquera (y al resto del grupo) por todas esas piscolas compartidas en los mejores viernes de mi vida. A Nicolás Salas, Benjamín Armijo y Denisse Urra por todas esas tardes de té, pastelitos y conversaciones de la vida. A Andrea Evangelista por seguir siendo mi amigo desde el otro lado del mundo.

Finalmente, quiero agradecer al DIQBM y a toda su gente. A quienes me han enseñado y a quienes he tenido la oportunidad de enseñar, con quienes haya podido compartir aunque sea un momento. Gracias por hacer de este paso por la facultad una mejor experiencia.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales	1
2. Marco Teórico	3
2.1. Cultivos en Perfusión	3
2.2. Caracterización Metabólica	4
2.3. Análisis de Flujos Metabólicos	5
2.4. PCV2 y su Producción en Células PK15	7
2.5. Producción en Hipotermia Moderada	8
2.6. Escalamiento de Cultivos de Células Mamíferas	9
2.7. Control en Cultivos de Células Mamíferas	11
3. Materiales y Métodos	14
3.1. Materiales	14
3.1.1. Reactivos	14
3.1.2. Equipos	15
3.1.3. Material de Laboratorio	15
3.2. Métodos	16
3.2.1. Cultivos Preliminares en Pseudoperfusión	16
3.2.2. Medición de Metabolitos	16
3.2.3. Caracterización del Metabolismo	17
3.2.4. Alimentación para Pseudoperfusión	19
3.2.5. Cultivos Mejorados en Pseudoperfusión	19
3.2.6. Análisis de Flujos Metabólicos	20
3.2.7. Infecciones de Cultivos Adherentes con PCV2	20
3.2.8. Infección con PCV2 en Pseudoperfusión	21
3.2.9. Análisis de Agitación	22
3.2.10. Análisis de Aireación	23
4. Resultados y Discusiones	25
4.1. Estudio del Cultivo en Pseudoperfusión	25
4.1.1. Cultivos Preliminares	25
4.1.2. Alimentación para Cultivos a Baja Perfusión	27
4.1.3. Cultivos Mejorados en Pseudoperfusión	28
4.1.4. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA)	30
4.1.5. Propuesta Final de Medio para Alimentación	31

4.2.	Estudio de la Producción de PCV2	33
4.2.1.	Pruebas del Protocolo Original de Infección	33
4.2.2.	Infección con Concanavalina A	34
4.2.3.	Infección en Hipotermia Moderada	34
4.2.4.	Infección en Pseudoperfusión	35
4.3.	Análisis para el Escalamiento	37
4.3.1.	Tren de Inoculación	37
4.3.2.	Producción de PCV2	38
4.3.3.	Análisis de Agitación y Aireación	42
4.3.4.	Análisis de Instrumentación y Control	43
5.	Conclusiones	45
6.	Anexos	46
	Anexo 1: Reacciones del Modelo Metabólico	46
	Anexo 2: Composición del Medio Basal	48
	Anexo 3: Mediciones de Aminoácidos, Tasas y Flujos Metabólicos (Cultivo Preliminar) .	49
	Anexo 4: Mediciones de Aminoácidos, Tasas y Flujos Metabólicos (Cultivo Mejorado) .	52
7.	Bibliografía	55

Índice de Tablas

2.1. Ventajas y desventajas de aparatos de retención para perfusión.	4
4.1. Parámetros de cultivo para pseudoperfusión inicial.	26
4.2. Composición de glucosa y aminoácidos en la alimentación concentrada.	27
4.3. Parámetros de cultivo para pseudoperfusión mejorada.	29
4.4. Composición de glucosa y aminoácidos propuesta para alimentación mejorada. . .	32
4.5. Resumen de cultivos para el tren de inoculación	38
4.6. Velocidad de agitación para biorreactores	42
4.7. Velocidad de aireación para biorreactores (por balance)	43
4.8. Sensores requeridos para biorreactores del proceso	43
4.9. Control propuesto para las variables del proceso	44
5.1. Composición del medio de cultivo DMEM/F12 1:1	48
5.2. Tasas de consumo o producción en pseudoperfusión inicial.	50
5.3. Flujos metabólicos calculados para pseudoperfusión inicial.	51
5.4. Tasas de consumo o producción en pseudoperfusión mejorada.	53
5.5. Flujos metabólicos calculados para pseudoperfusión mejorada.	54

Índice de Ilustraciones

2.1. Esquema de un proceso en perfusión.	3
2.2. Modelo metabólico considerado.	6
2.3. Mecanismo propuesto para la infección con PCV2.[11]	7
3.1. <i>Spinner flask</i> utilizado para los cultivos.	16
4.1. Curva de crecimiento inicial en pseudoperfusión, donde se presenta el promedio de un duplicado biológico. Se muestran valores para densidad celular (◆), viabilidad (×), glucosa (◆) y lactato (▲).	25
4.2. Concentración de aminoácidos con diferentes comportamientos durante pseudoperfusión inicial. Resultados de duplicado biológico para glutamato (◆), glutamina (●) y treonina (■).	26
4.3. Curva de crecimiento mejorada en pseudoperfusión, donde se presenta el promedio de un duplicado biológico. Se muestran valores para densidad celular (◆), viabilidad (×), glucosa (◆) y lactato (▲).	28
4.4. Concentración de ciertos aminoácidos durante pseudoperfusión mejorada. Resultados de duplicado biológico para glutamato (◆), glutamina (●) y treonina (■).	29
4.5. Distribución de flujos metabólicos en la pseudoperfusión original (negro) y mejorada (gris).	30
4.6. Equivalentes virales por célula producidos en condiciones basales de infección.	33
4.7. Equivalentes virales por célula producidos con y sin preincubación con concanavalina A.	34
4.8. Equivalentes virales por célula producidos a 37°C y 34°C.	35
4.9. Equivalentes virales por célula producidos en cultivos a baja y alta densidad.	35
4.10. Diagrama del tren de inoculación propuesto para el proceso	37
4.11. Etapa de preincubación con concanavalina A.	39
4.12. Etapa de infección con PCV2.	39
4.13. Etapa de incubación con glucosamina.	40
4.14. Etapa de lavado con PBS.	40
4.15. Etapa de incubación cloroquina.	41
4.16. Etapa de pasaje y cultivo final.	41
4.17. Valores de velocidad de agitación para diferentes biorreactores	42
4.18. Saturación de oxígeno y ajuste para obtención de $K_L a$	43
5.1. Concentración de aminoácidos durante pseudoperfusión inicial.	49
5.2. Concentración de aminoácidos durante pseudoperfusión mejorada.	52

Capítulo 1 : Introducción

1.1. Antecedentes Generales

La cepa virulenta de circovirus porcino (PCV2) es un patógeno que afecta a los cerdos (*Sus scrofa domestica*) provocando la enfermedad conocida como síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWD). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Canadá en el año 1991 y afecta principalmente a cerdos jóvenes, impactando negativamente a la industria porcina en al menos tres aspectos: un aumento de la mortalidad de los lechones, una disminución de la ganancia de peso de los animales en el tiempo (con el consecuente menor peso alcanzado en la etapa adulta), y un aumento en el uso rutinario de antibióticos [1].

La vacunación de las cerdas preñadas y de los lechones recién nacidos ha probado ser el método más efectivo para prevenir el contagio de la enfermedad. Las primeras vacunas comerciales fueron introducidas en el período 2004-2006, basadas principalmente en la inactivación de la cepa PCV2a del virus, y su uso se ha vuelto extensivo en la industria del cerdo, con tasas de vacunación que superan al 80 % de los lechones en países como Chile, Alemania, Brasil y Corea del Sur [1].

La línea celular epitelial de riñón porcino PK15 es utilizada ampliamente como hospedero para la producción de PCV2 [2], el cual es posteriormente inactivado para su uso como vacuna. La empresa chilena Veterquímica S.A. cuenta dentro de su cartera de productos con una vacuna para la prevención del PMWD, cuyo proceso productivo se basa en el cultivo de células PK15 y su posterior infección con PCV2.

La empresa basa su proceso de producción de antígeno viral en el cultivo adherente de células PK15. Este tipo de cultivo requiere del uso de tratamientos enzimáticos para la expansión y posterior subcultivo de las células [3], lo que implica que cada cultivo debe ser manipulado por separado para adicionar la solución con la enzima, separar la suspensión de células desde el material de anclaje y distribuir las células en los nuevos recipientes. Si bien existen sistemas para facilitar esta labor, el escalamiento de la producción se ve seriamente limitado por la necesidad de más espacio físico y de incubadoras, así como el requerimiento de trabajadores altamente calificados y de un alto riesgo de contaminación asociado a la manipulación.

La adaptación de la línea celular PK15 al cultivo en suspensión ha sido realizada con éxito en trabajos anteriores [4], lo que permite sortear los problemas operacionales discutidos anteriormente. Sin embargo, la densidad celular alcanzada en estos cultivos se encuentra en torno a los $1,5 \cdot 10^6$ [cells/mL] y solo se han realizado pruebas preliminares relacionadas con el aumento de la productividad de estos cultivos, por lo que una segunda etapa en la mejora del proceso productivo

corresponde a la búsqueda de estrategias que permitan alcanzar una mayor concentración de biomasa y una mayor productividad específica de antígeno viral. Asimismo, se deben proponer estrategias para trasladar estas modificaciones a una escala de planta piloto antes de incorporarlas al proceso productivo.

El objetivo general de esta memoria es proponer mejoras en el proceso productivo de una vacuna contra el síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWD) comercializada por la empresa Veterquímica S.A. Los objetivos específicos de la memoria son:

- Mejorar la productividad de biomasa en el cultivo en suspensión de células PK15 utilizando la modalidad de pseudoperfusión.
- Evaluar cambios en el protocolo de infección viral para aumentar la productividad específica de PCV2 en células PK15.
- Definir estrategias para trasladar estas modificaciones a una planta piloto.

Capítulo 2 : Marco Teórico

2.1. Cultivos en Perfusión

La perfusión corresponde a un modo de operación en el cual un biorreactor tiene una entrada continua de medio de cultivo fresco, así como una salida continua de medio agotado y células. Sin embargo, las células en la salida son separadas y devueltas al cultivo mediante una unidad de retención [5]. Un esquema general de un proceso de perfusión se muestra en la Figura 2.1.

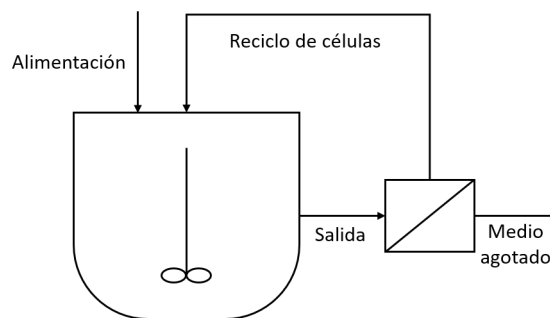


Figura 2.1: Esquema de un proceso en perfusión.

Los cultivos en perfusión permiten lograr densidades celulares mayores a los cultivos en modos batch o fed-batch, gracias a que los nutrientes son suministrados y los productos de desecho son retirados de manera continua, por lo que la principal limitante del cultivo deja de estar en los nutrientes. La biomasa máxima alcanzable pasa a estar limitada por un segundo factor, como la capacidad de retención de células o la tasa de transferencia de oxígeno [5]. Otro punto relevante con respecto a los cultivos en perfusión es que, a diferencia de los cultivos continuos, los flujos con los que opera el biorreactor no se encuentran limitados por la tasa de crecimiento máximo de las células [6].

Las desventajas más importantes de este modo de operación son la necesidad de utilizar equipos complementarios para el proceso, incluyendo el aparato de retención, bombas y estanques auxiliares. Las corridas en perfusión deben operar por tiempos más prolongados y requieren de una mayor cantidad de medio de cultivo, cuando se compara con el proceso batch [5].

Con respecto a los equipos de retención, existen múltiples alternativas, que incluyen sedimentadores, centrífugas, hidrociclones, filtros y separadores acústicos. Todos estos sistemas presentan ventajas y desventajas con respecto a su escalabilidad, su efecto sobre la viabilidad celular, su costo, entre otros. Un resumen de las principales ventajas y desventajas de equipos de retención se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Ventajas y desventajas de aparatos de retención para perfusión.

Equipo	Ventajas	Desventajas
Sedimentadores inclinados	Operación muy simple.	Tiempos de residencia prolongados pueden llevar a pérdida de viabilidad.
Centrífugas	Simple de escalar. Pocos efectos sobre viabilidad.	Altos costos de inversión. Altos costos de mantención.
Hidro ciclones	Bajos costos de operación. Separa células viables y no viables.	Difícil de escalar para flujos altos. Poco eficiente para células pequeñas.
Filtros	Alta eficiencia de separación. Bajo daño sobre las células.	Necesidad de ciclos de lavado. <i>Fouling</i> de membranas a largo plazo.
Separadores acústicos	Operación muy simple.	Difíciles de escalar. Producen aglomerados celulares.

Con el objetivo de diseñar un proceso de perfusión en laboratorio, las principales condiciones de operación se pueden probar en sistemas de pseudoperfusión (también conocidos como semiperfusión o quasiperfusión) en los que se utiliza un cultivo en matraces agitados, *spinner flasks* o tubos ventilados, realizando los cambios de medio de manera manual con ayuda de una centrifuga [7].

Los sistemas de pseudoperfusión difieren de una perfusión real en la cinética del cambio de concentración de nutrientes, que es mucho más abrupta para el primer caso. El uso de múltiples cambios parciales de medio de cultivo al día permite acercar más el modelo de pseudoperfusión al caso real, pero supone una carga de trabajo mucho mayor [7]. A pesar de las diferencias en la cinética, los sistemas de pseudoperfusión han mostrado una alta similitud en término de las tasas específicas de producción o consumo de nutrientes cuando se las compara con las obtenidas en sistemas de perfusión real [8].

2.2. Caracterización Metabólica

Una caracterización metabólica consiste en la obtención de las tasas a las que los diferentes metabolitos presentes en un cultivo son producidos o consumidos por las células. Estas tasas permiten analizar el comportamiento de las reacciones del metabolismo, identificar puntos que podrían ser objetivos para ingeniería metabólica y predecir el comportamiento del cultivo en el tiempo o frente a perturbaciones [6].

La caracterización comienza por la adquisición de datos sobre las cantidades intracelulares y extracelulares de metabolitos para diferentes puntos del cultivo mediante una diversidad de técnicas analíticas. Los principales datos que se analizan en un cultivo de células mamíferas corresponden a la cantidad de células, la viabilidad celular, el oxígeno disuelto, pH, nutrientes (principalmente glucosa y aminoácidos), desechos (principalmente amonio y lactato) y productos (normalmente proteínas).

Los datos obtenidos desde los cultivos deben ser corregidos por los cambios de volumen que ocurren debido a la alimentación de medio en cultivos operados en modo fed-batch o perfusión, con el objetivo de que los datos experimentales puedan ser ajustados mediante funciones continuas.

Lo anterior se logra mediante el cálculo de cantidades acumulativas, donde se considera el total de cada especie presente en el cultivo y no sólo su concentración.

Desde los datos acumulativos es posible obtener una función que muestra el comportamiento general de los datos experimentales en el tiempo y que es capaz de eliminar parte del error asociado a las técnicas de medición. A partir de este ajuste se pueden obtener las tasas de consumo o producción específicas para cada metabolito cuando se toma la derivada del ajuste acumulativo y se corrige por el número de células [6].

2.3. Análisis de Flujos Metabólicos

Un modelo metabólico permite representar un sistema biológico por medio de ecuaciones químicas. En particular, el Análisis de Flujos Metabólicos (MFA) permite representar el metabolismo por medio de balances de masa de las especies involucradas, y tiene como objetivo poder predecir la distribución de flujos de cada especie al interior de la célula [6].

Para la resolución de este tipo de modelos, se utiliza un sistema de ecuaciones de balances de masas, así como las tasas de producción o consumo calculadas a partir de datos experimentales, para encontrar las velocidades de cada reacción del metabolismo. La resolución se basa en el método de los mínimos cuadrados de acuerdo con la ecuación (2.1), donde v representa el vector de velocidades de reacción, S representa la matriz estequiométrica del metabolismo y r corresponde a las tasas de consumo o producción de metabolitos.

$$v = (S^T S)^{-1} S^T r \quad (2.1)$$

Los resultados de este tipo de análisis permiten identificar los nutrientes que están funcionando como limitantes en la producción de biomasa o en la síntesis de producto. Esto, a su vez, sirve para determinar qué modificaciones se deben realizar al medio de cultivo para mejorar la productividad. Los MFA también se pueden utilizar para identificar puntos en los que una modificación transcripcional podría tener efectos positivos en el desarrollo del cultivo [9].

Los resultados de MFA están sujetos a múltiples limitaciones que provienen de la forma en que se construye y resuelve el modelo, así como de los datos que se utilizan. En primer lugar, el balance de masas es difícil de cerrar ya que existen múltiples metabolitos que no se pueden medir, como algunos componentes del suero, el CO_2 liberado o el agua producida.

Otras limitaciones incluyen la dificultad para determinar de manera precisa la composición de la biomasa, los errores asociados a los métodos de medición de metabolitos en bajas concentraciones, la necesidad de simplificar las redes metabólicas para facilitar la resolución del modelo, y la complejidad de incorporar especies diferentes a carbono y nitrógeno en el balance del sistema. Este último punto es relevante, ya que en el metabolismo energético juegan roles relevantes el intercambio de hidrógeno, el consumo de oxígeno y la producción de ATP.

Una red metabólica básica se ha construido a partir de un modelo utilizado anteriormente para células CHO [10] que considera rutas metabólicas altamente conservadas en células mamíferas. Un

esquema representativo del modelo metabólico se muestra en la Figura 2.2 donde las principales rutas consideradas corresponden a:

- Glicólisis
- Ciclo de Krebs
- Fermentación láctica
- Metabolismo de aminoácidos
- Generación de biomasa

El detalle de las reacciones consideradas se encuentra en Anexo 1.

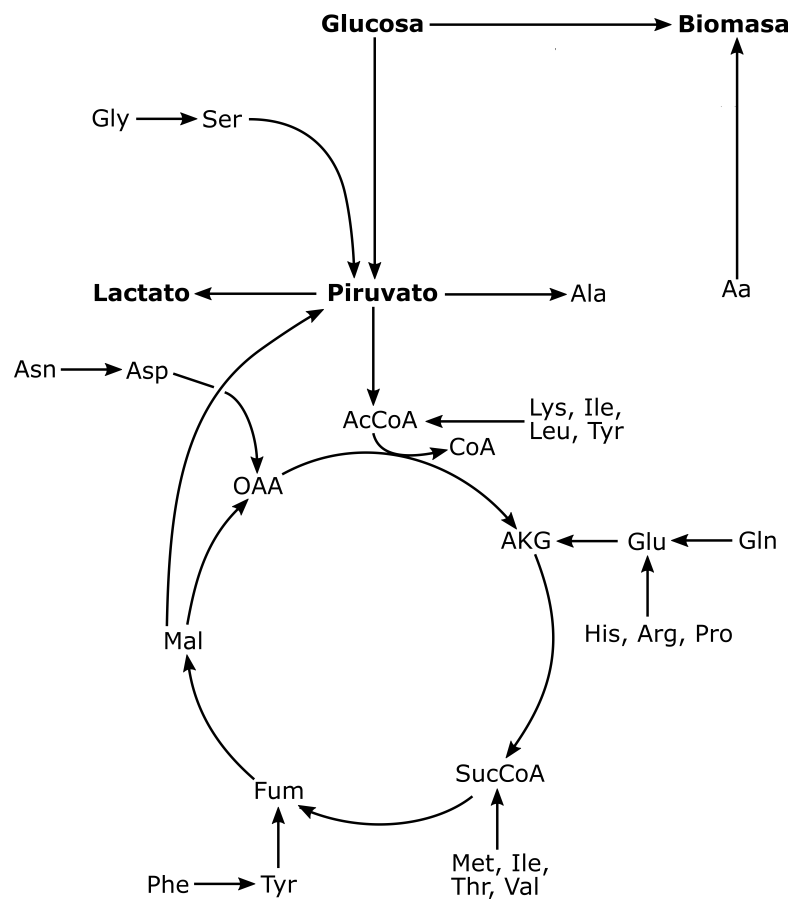


Figura 2.2: Modelo metabólico considerado.

2.4. PCV2 y su Producción en Células PK15

El virus de interés PCV2 es capaz de infectar células de cerdo con un tropismo variable que depende de la etapa del desarrollo en la que se encuentre el animal. Mientras que es capaz de infectar todos los tipos de células de un embrión, sólo las células del corazón, hígado y algunos tipos de linfocitos pueden ser infectados en estado fetal. En lechones y cerdos adultos, la infección solo afecta al linaje monocítico de linfocitos [11].

La infección con PCV2 resulta mortal en estado embrionario, pero solo algunos lechones y cerdos adultos desarrollan la enfermedad (PMWD), la cual se caracteriza por la depleción de linfoblastos y otras células blancas productos de la lisis celular asociada a la producción excesiva del virus. No está claro qué factores determinan la existencia de poblaciones de animales que, a pesar de estar infectadas, no desarrollan la enfermedad.

La Figura 2.3 muestra el mecanismo de infección de PCV2 propuesto por Nauwynck et al. [11] que considera las siguientes etapas:

- (A) Unión inespecífica del virus a la superficie celular.
- (B) Endocitosis mediada por clatrina (linaje monocítico).
- (C) Endocitosis sin mediación (células epiteliales).
- (D) Pérdida de la cubierta con caída de pH.
- (E) Pérdida de la cubierta sin caída de pH.
- (F) Ingreso del material genético al núcleo.
- (G) Acumulación del virus sin pérdida de cubierta.

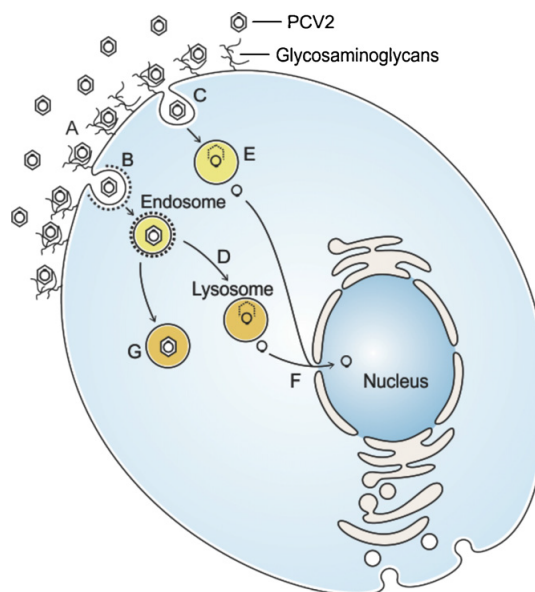


Figura 2.3: Mecanismo propuesto para la infección con PCV2.[11]

La línea celular proveniente de epitelio de riñón de cerdo PK15 se encuentra infectada de manera persistente con PCV2, pero el virus no se replica a una tasa suficiente para ser utilizada con fines productivos. La infección de las células utilizando soluciones con PCV2 es muy poco eficiente, teniéndose que menos de un 5 % de las células expuestas al virus lo producen.

Estudios relacionados al aumento de la productividad de PCV2 en cultivos de PK15 han logrado aumentar la cantidad de células que producen activamente el virus a más de un 30 % mediante el tratamiento con una solución glucosamina posterior a la exposición con el virus. Si bien no se ha dilucidado el mecanismo mediante el cual la glucosamina actúa, se ha propuesto que facilita el ingreso del material genético del virus al núcleo celular [12].

Estudios posteriores han mostrado que diferentes reactivos que actúan sobre la integridad de las membranas celulares, como la lectina concanavalina A o el disruptor del colesterol metil- β -ciclodextrina, permiten aumentar la eficiencia de infección de PCV2 en PK15 [13]. También se ha mostrado que el tratamiento con interferón- γ produce un aumento en la cantidad de virus producido, aunque no se ha propuesto un mecanismo para este fenómeno [14].

El rol de la degradación del virus en el sistema endosoma-lisosoma también ha sido estudiado, mostrando que en líneas epiteliales (como PK15), una reducción del pH de este sistema tiene como consecuencia que se inhiba parcialmente la liberación del material genético viral dentro de la célula. La utilización de reactivos que evitan la acidificación del sistema endosoma-lisosoma (como cloruro de amonio, cloroquina y monensina) han mostrado un aumento en la productividad de PCV2 [14]. El proceso productivo que se quiere mejorar incluye tratamientos con glucosamina y cloroquina en las etapas de infección de células PK15 con PCV2.

2.5. Producción en Hipotermia Moderada

La tasa de crecimiento de las células mamíferas disminuye cuando estas son cultivadas a temperaturas ligeramente menores al óptimo de 37°C. Sin embargo, múltiples trabajos han mostrado que en condiciones de hipotermia moderada (entre 28°C a 34°C) se puede aumentar la tasa específica de producción de proteínas recombinantes [15] [16] [17].

Si bien esta observación ha mostrado ser consistente en cultivos de algunos tipos de células CHO, en otros casos se ha observado la mantención o disminución de la productividad del cultivo. En conjunto, las investigaciones muestran que el aumento de la productividad en condiciones de hipotermia moderada depende de la línea celular, del producto y de la construcción genética que se utilicen.

El mecanismo por el que se produce un aumento de productividad no está totalmente claro, pero se ha encontrado evidencia del arresto de las células en la etapa G₁ del ciclo celular, así como de la disminución de la apoptosis y del aumento de la concentración del mRNA asociado al producto [17]. Esto tendría como consecuencias la disminución general del metabolismo celular, una mejora en la viabilidad del cultivo y un aumento en la actividad transcripcional asociada al producto de interés.

Dado que la disminución de temperatura compromete la tasa de crecimiento, la estrategia general

para maximizar el producto total obtenido es utilizar un proceso en dos fases, donde se obtiene en primer lugar una concentración adecuada de células, para luego disminuir la temperatura. Esto determina un escenario de *trade-off* entre una alta concentración de biomasa a 37°C y una alta productividad específica a menores temperaturas [15], por lo que es necesario encontrar un tiempo adecuado en el cual llevar a cabo el cambio de temperatura.

2.6. Escalamiento de Cultivos de Células Mamíferas

El escalamiento corresponde al aumento de la escala en la que trabaja una operación unitaria, generalmente para su traslado desde un laboratorio a una planta piloto, o desde esta última a un contexto de producción industrial. Cuando se habla de células mamíferas el parámetro a escalar corresponde al volumen de cultivo, y este se puede encontrar en un rango amplio entre 10 [L] y 20.000 [L], aproximadamente [6].

El objetivo de un escalamiento es definir un rango de parámetros físicos y mecánicos que permitan mantener la productividad del cultivo. En primer lugar, se debe definir la forma en que se lleva a cabo la inoculación del biorreactor, utilizando una densidad inicial tal que permita alcanzar la etapa exponencial de crecimiento en un tiempo corto. Para esto, se debe establecer un ratio inóculo/cultivo adecuado en función de la velocidad específica de crecimiento, y se debe seleccionar el modo de cultivo pertinente para cada etapa del tren de inoculación [18].

Por otro lado, se debe ajustar la agitación con el objetivo de mantener constantes tres características del cultivo entre las diferentes escalas [19]. En primer lugar, la homogeneidad de la mezcla que depende de la potencia por unidad de volumen P/V (2.2) aplicada al cultivo; en segundo lugar, el esfuerzo de corte al que se enfrentan las células, que se relaciona con la velocidad tangencial al agitador τ (2.3); y por último, el régimen turbulento del fluido que depende del valor del número de Reynolds en torno al agitador R_{e_i} (2.4).

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p \rho N^3 D_i^5}{\pi H D_T^2} \quad (2.2)$$

$$\tau = \pi N D_i \quad (2.3)$$

$$R_{e_i} = \frac{\rho N D_i^2}{\mu} \quad (2.4)$$

Donde:

N_p : Número de potencia.

ρ : Densidad.

N : Velocidad de agitación.

D_i : Diámetro del agitador.

H : Altura del cultivo en el biorreactor.

D_T : Diámetro del biorreactor.

μ : Viscosidad del cultivo.

Otro aspecto a considerar es la disponibilidad de oxígeno, ya que se considera que los cultivos de células mamíferas con una escala mayor a 1000 [mL] deben tener una fuente de oxigenación diferente al intercambio superficial de gases [18]. La forma más común de suministrar oxígeno en estos casos es mediante la insuflación de aire a través de un *sparger* en el fondo del biorreactor, lo que genera microburbujas de aire que intercambian oxígeno y otros gases con el medio de cultivo al viajar desde el fondo del equipo hasta la superficie del líquido [19]. El flujo de oxígeno que se debe transferir desde el medio de cultivo a las células se puede expresar mediante la Tasa de Transferencia de Oxígeno (OTR):

$$OTR = K_L a (c^* - c) \cdot V \quad (2.5)$$

Donde:

$K_L a$: Coeficiente global de transferencia de oxígeno [h^{-1}].

c^* : Concentración de equilibrio del oxígeno en la interfase gas-líquido [mM].

c : Concentración de oxígeno en el líquido [mM].

V : Volumen de cultivo [L].

Por otro lado, el flujo de oxígeno que se transfiere desde el aire insuflado al medio de cultivo se puede obtener desde el balance de masas en el biorreactor si se asume un comportamiento de gases ideales. A este valor se le denomina Tasa de Consumo de Oxígeno (OUR):

$$OUR = \frac{P}{RT} (Q_{in} \cdot Y_{O_2in} - Q_{out} \cdot Y_{O_2out}) \quad (2.6)$$

Donde:

P : Presión del biorreactor [atm].

R : Constante de los gases ideales (0,082 [atm L mol⁻¹ K⁻¹]).

T : Temperatura [K].

Q : Flujo de aire [L/h].

Y_{O_2} : Fracción de oxígeno en el aire.

Si se asume que la operación ocurre en estado estacionario, se tiene:

$$OUR = OTR \quad (2.7)$$

El flujo de aire requerido se expresa normalmente como volúmenes de aire por volúmenes de reactor por minuto ($vvm = Q/V$), valor que se debería mantener constante para diferentes escalas. Para comparar entre equipos se utiliza el flujo de aire normalizado por el área transversal del biorreactor, lo que se conoce como velocidad superficial ($v_s = Q/A$), cuyo valor para cultivos de células mamíferas se encuentra normalmente dentro del rango de 40 [cm/h] a 720 [cm/h] [20].

Para encontrar el valor del coeficiente $K_L a$ se puede utilizar el método dinámico, en el cual se mide la saturación de oxígeno en una solución de células en cultivo en un recipiente cerrado sin espacio de cabeza. Dado lo anterior, el cambio en la saturación de oxígeno del sistema corresponde con su consumo, por lo que se cumple:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a(c^* - c) \quad (2.8)$$

Dada la ecuación diferencial (2.8) el valor de $K_L a$ se puede encontrar como la pendiente de la sección recta que se obtiene al graficar el logaritmo natural de $(c^* - c)$ frente al tiempo [19].

2.7. Control en Cultivos de Células Mamíferas

El control de las condiciones de operación en cultivos de células mamíferas es clave para mantener la productividad del proceso de acuerdo con los objetivos de diseño, especialmente en cultivos con alta densidad celular. Para que esto sea posible se necesita disponer de una instrumentación que permita obtener el estado actual del cultivo, y de actuadores, que permitan modificar las condiciones del cultivo cuando estas se alejan del rango definido en la etapa de diseño.

Debido a la necesidad de mantener la barrera de esterilidad en este tipo de procesos se prefiere utilizar instrumentación que funcione en línea, es decir, de manera automática (que no requiere interacción con un operador), *in situ* (montada al interior del biorreactor) y en tiempo real (la información está disponibles en tiempos razonables frente a la dinámica del proceso) [21].

Con respecto al actuador, este depende de la variable a controlar, aunque generalmente se refiere a modificaciones en los flujos de medio de cultivo, gases o calor que ingresan o salen del biorreactor. Para definir la magnitud de esta acción, el equipo debe contar con un controlador, teniéndose que la mayoría de biorreactores comerciales tienen incorporado un sistema PID adaptativo [22].

A continuación se presentan un resumen de las principales variables de un proceso con células animales que deben ser medidas y controladas:

1. **Temperatura:** Las cinéticas de crecimiento y de generación de producto dependen de esta. La generación de calor en cultivos de células mamíferas usualmente es despreciable si se

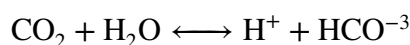
compara con lo que ocurre en cultivos de microorganismos [19], por lo que la acción de control en estos sistemas se centra comúnmente en calentar con el objetivo de mantener la temperatura óptima de 37°C. Sin embargo, en algunos casos puede ser relevante contar con un sistema de enfriamiento, como cuando se realizan cultivos en hipotermia moderada.

Tradicionalmente, la medición de temperatura se realiza de manera manual mediante termómetros de mercurio o alcohol montados en el biorreactor. La necesidad de una medición totalmente en línea ha cambiado esta tendencia por el uso de termocuplas con sistemas de adquisición de datos en tiempo real.

2. **pH:** También afecta la velocidad de crecimiento y puede tener efectos considerables en la viabilidad del cultivo. El metabolismo de las células modifica el pH del medio de cultivo debido a la producción de lactato, la acumulación de CO₂ y los diversos efectos del metabolismo de aminoácidos.

En general, se espera que el pH del cultivo se mantenga lo más cercano posible a 7,4, para lo que se adicionan pequeñas cantidades de una solución de ácido o base concentradas cada vez que la medición se desvía de este valor. La utilización de este método tradicional de control tiene como consecuencia un aumento de la concentración de iones (osmolaridad) en el medio de cultivo, lo que puede disminuir la viabilidad de las células.

Un método alternativo de control corresponde a la modificación de la concentración de ácido carbónico disuelto en el medio variando el flujo y composición del gas que se ingresa al biorreactor, aprovechando el siguiente equilibrio químico que se forma entre este ácido y el CO₂:



Este sistema evita los problemas relacionados a la osmolaridad, pero dado que se acopla con el control de oxígeno y CO₂, puede requerir de un controlador más sofisticado para funcionar adecuadamente [21].

3. **Densidad celular:** La medición de esta variable en línea utiliza comúnmente la densidad óptica del cultivo. Este método requiere de calibración específica para la línea celular y los posibles elementos que interfieren con la medición (indicadores de pH y burbujas de gas), y no permite obtener información sobre la viabilidad del cultivo.

Otra forma de medir densidad celular es mediante sensores de impedancia, aunque este tipo de sensores no son tan utilizados y presentan problemas similares a los de tipo óptico. El uso de citometría de flujo continua es una alternativa de medición mucho más exacta pero que tiene costos muy elevados.

4. **O₂:** La disponibilidad de este gas en muchos casos determina el estado metabólico del cultivo y su ausencia puede resultar en la pérdida de viabilidad. Se ha observado que la mayoría de las líneas celulares crecen y producen adecuadamente en un rango amplio de saturación de oxígeno entre 20 % y 80 %.

Los sensores más utilizados corresponden a electrodos cubiertos de membranas selectivas, que son propensos a ser dañados durante la operación y que se descalibran fácilmente. Nue-

vos sensores basados en la capacidad del oxígeno de disminuir la fluorescencia emitida por diversas sustancias (*quenching*) han surgido como una alternativa ampliamente utilizada en bioprocesos, ya que son mucho más estables durante la operación.

5. **CO₂**: Este metabolito tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento cuando hay concentraciones mayores al 15 % o 20 % de saturación en el medio. Para disminuir su concentración se utiliza el flujo de gas de aireación, que al ser pobre en CO₂ permite desorberlo del medio.

Su medición se puede correlacionar con el pH, pero se prefiere el uso de electrodos específicos para obtener una medición exacta.

6. **Glucosa**: Corresponde a un parámetro crítico, ya que valores muy altos o muy bajos comprometen la viabilidad del cultivo y la eficiencia del metabolismo. Los valores tradicionales de glucosa en los medios de cultivo para líneas celulares se encuentran en el rango de 5,5 [mM] a 20 [mM].

La medición en línea de glucosa se puede realizar mediante sensores enzimáticos, que reaccionan con la molécula y producen especies fácilmente medibles, como protones o peróxidos. Estos sensores son sensibles y tienden a descalibrarse, por lo que se requieren mediciones fuera de línea regulares como control.

Capítulo 3 : Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

- Ácido ascórbico (Sigma, A4544)
- Azul tripán (Sigma, T8154)
- Bicarbonato de Sodio (Merk, 106392)
- Buffer fosfato salino (Gibco, 21600-010)
- Cilindro CO₂ (Linde)
- Cristal violeta (Merk, 42555)
- DMEM (Gibco, 12100-046)
- Etanolamina (Sigma, E0135)
- Suero Bovino Fetal (FBS) (Biowest, S1560)
- Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco, 21700-075)
- Kit glucosa (Biosystems, 12800)
- Kit lactato (Biosystems, 12802)
- Kit amonio (Biosystems, 12809)
- Pluronic F68 (Sigma, 9003-11-6)
- Putrescina (Sigma, P5780)
- Selenito de Sodio (Sigma, S5261)
- AccQ·Tag Ultra Derivatization Kit (Waters, 186003836)
- Estándar de aminoácidos (Sigma, AAS18)
- Difosfato de cloroquina (Sigma, C6628)
- Hidrocloruro de glucosamina (Sigma, G4875)
- HEPES (Sigma, H3375)
- Hank's Balanced Salts Solution (Sigma, H6648)
- MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco, 11140050)
- Glucosa (Gibco, 15023021)
- Cisteína (Sigma, A9165)
- Lisina (Sigma, L5501)
- Leucina (Sigma, L8912)
- Glutamina (Gibco, 21051024)
- Histidina (Sigma, H6034)
- Isoleucina (Sigma, I5281)
- Metionina (Sigma, M5308)

- Treonina (Sigma, T8441)
- Tirosina (Sigma, T8566)
- Fenilalanina (Sigma, P5482)
- Acetonitrilo (Sigma, 34881)
- Acetato de sodio (Merck, S2889)
- Trietilamina (Fisher, 10625892)
- EDTA (Merck, 1084180250)
- Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Sigma, C2631)

3.1.2. Equipos

- Agitador magnético (Barnstead Thermolyne, 45600 CellgroTM Stirrer)
- Analizador automático en Random Access. (Biosystem, Y15)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar (Nuare, Nu201330E)
- Centrifuga Boeco C-28
- Centrifuga Eppendorf 5403
- Incubadora (Shel Lab, TC2323)
- Microscopio (Olympus, CK2)
- pHmetro (HANNA)
- Refrigerador -80°C (SO-LOW, U85-13)
- Cromatógrafo Líquido a Alta Presión (Shimadzu Prominence Series 2)
- Columna de cromatografía Brownlee SPP C18

3.1.3. Material de Laboratorio

- Agua Desionizada
- Agua Destilada
- Botellas 250 y 500 mL
- Cámara Neubauer
- Contador
- Etanol
- Filtros 0,2 μm (Sigma)
- Micropipetas p1000, p200 y p20
- Pipeta plástica estéril 2, 5, 10 y 25 mL
- Propipeta (Drummond)
- Puntas p1000, p200 y p20
- Rotor de reacción (Biosystems, AC11485)
- Spinner flask 100 mL (Wheaton)
- T-flask 75
- Tubos eppendorf 1,5 y 0,6 mL
- Tubos falcon 15 y 50 mL

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivos Preliminares en Pseudoperfusión

Se llevaron a cabo cultivos por duplicado utilizando *spinner flasks* (Figura 3.1) con 60 [mL] de volumen efectivo. Las condiciones de cultivo fueron 5 % CO₂, 37°C, atmósfera saturada en humedad, 110 [rpm] de agitación y sin aireación externa. El medio utilizado fue una mezcla DMEM/F12 1:1 con 5 % FBS y suplementado con antioxidantes (ver composición en Anexo 2).



Figura 3.1: *Spinner flask* utilizado para los cultivos.

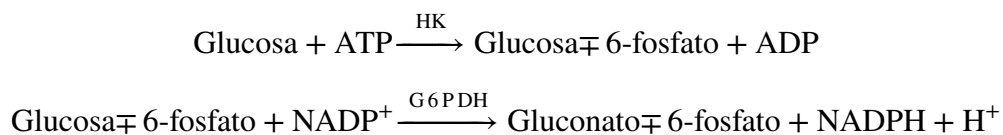
Se inocularon los *spinner flasks* con células provenientes de cultivos confluentes en *T-flasks* de 75 [cm²] tal que se alcanza una concentración inicial de $0,2 \cdot 10^6$ [cells/mL].

La pseudoperfusión se inicia cuando el cultivo alcanza las $1,2 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Para esto, se toma la mitad del volumen de cultivo, se centrifuga a 700 [rpm] durante 5 minutos y se desecha el medio agotado. Las células se resuspenden en medio fresco y se devuelven al *spinner flask*.

Cada vez que se cambió el medio de cultivo, se tomaron muestras de 1,5 [mL] y se determinó la densidad celular utilizando el método de exclusión por azul tripán en un hematocitómetro. El sobrenadante sin células se almacenó a -20°C para análisis posteriores.

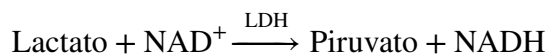
3.2.2. Medición de Metabolitos

Las muestras de sobrenadante fueron analizadas utilizando reactivos enzimáticos acoplados a métodos colorimétricos en el equipo Analyzer Y15 de Biosystems. Para medir glucosa, se llevan a cabo las siguientes reacciones enzimáticas mediadas por hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P DH):



La concentración de NADPH producido se puede determinar mediante espectrofotometría a 340 [nm] y se compara con la obtenida desde un estándar de glucosa 3 [g/L] para encontrar la concentración en la muestra de interés.

Para el caso del lactato, la muestra se hace reaccionar utilizando la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de acuerdo a la reacción:



La concentración de NADH generado se determina mediante espectrofotometría a 340 [nm] y se compara con la obtenida desde un estándar de lactato 0,5 [g/L] para encontrar la concentración en la muestra de interés.

Para medir amonio, la muestra se hace reaccionar mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) según la reacción:



La concentración remanente de NADH se determina mediante espectrofotometría a 340 [nm] y se compara con la obtenida desde un estándar de amonio 150 [mg/mL] para encontrar la concentración en la muestra de interés.

Para determinar la concentración de los aminoácidos en las muestras, estas fueron filtradas y tratadas con 6-aminoquinolol-N-hidroxisuccinimidil carbamato de acuerdo a las instrucciones presentes en el kit AccQ·Tag de Waters. Este compuesto reacciona con el grupo aminoácido para generar un derivado fluorescente.

Las muestras derivatizadas se pasan por una columna Brownlee SPP C18 de 2,5 [mL] al interior del equipo para cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Prominence de Shimadzu. La matriz hidrofóbica de la columna retiene los aminoácidos cuando se encuentran en una solución buffer de acetato de sodio. Posteriormente, los aminoácidos se eluyen diferencialmente ocupando un gradiente de acetonitrilo/acetato de sodio y se mide la fluorescencia presente a la salida del equipo.

Las concentraciones de aminoácidos se estimaron comparando la intensidad de fluorescencia presente en los perfiles de elución para cada muestra con aquella detectada para un estándar de concentración conocida.

3.2.3. Caracterización del Metabolismo

Los datos de concentraciones obtenidas utilizando los métodos anteriores se utilizaron para calcular la cantidad de metabolito acumulado en cada punto del cultivo de acuerdo con la ecuación:

$$C_{ac}(t_i) = C_{ac}(t_{i-1}) + C(t_i) \cdot V(t_i) - C(t_{i-1}) \cdot (V(t_i) - V_a(t_{i-1})) - C_a \cdot V_a(t_{i-1})$$

Donde:

$C_{ac}(t_i)$: Milimoles acumulados del metabolito C en el tiempo i .

$C_{ac}(t_{i-1})$: Milimoles acumulados del metabolito C en el tiempo $i-1$.

$C(t_i)$: Concentración en milimolar del metabolito C en el tiempo i .

$C(t_{i-1})$: Concentración en milimolar del metabolito C en el tiempo $i-1$.

C_a : Concentración en milimolar del metabolito C en la alimentación.

$V(t_i)$: Volumen del cultivo en litros en el tiempo i

$V_a(t_{i-1})$: Volumen alimentado en litros en el tiempo $i-1$

Se definió la etapa de crecimiento exponencial del cultivo como el rango de tiempo en el que los datos medidos de densidad celular se ajustan adecuadamente con una función exponencial. Tomando como supuesto que la velocidad de crecimiento en esta etapa es constante, se encontró la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) ajustando los datos de densidad celular a la siguiente ecuación de crecimiento:

$$X(t) = X_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t}$$

El tiempo de duplicación se calcula despejando t en la ecuación de crecimiento cuando $X(t) = 2X_0$, con lo que se obtiene:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$$

Desde los valores acumulativos obtenidos para cada metabolito se ajustó un polinomio \mathcal{P} a los datos que se encuentran dentro de la etapa de crecimiento exponencial y se calculó la tasa específica de producción o consumo de cada metabolito de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$q_C(t_i) = \frac{(d\mathcal{P}(t)/dt)|_{t_i}}{V(t_i) \cdot X(t_i)}$$

Donde:

$q_C(t_i)$: Tasa específica de consumo o producción del metabolito C en el tiempo i .

$(d\mathcal{P}(t)/dt)|_{t_i}$: Derivada del polinomio \mathcal{P} evaluada en el tiempo i .

$V(t_i)$: Volumen del cultivo en litros en el tiempo i .

$X(t_i)$: Cantidad de células por litro de cultivo en el tiempo i .

Finalmente, se define la razón entre lactato y glucosa como la tasa específica de producción de lactato dividida en la tasa específica de consumo de glucosa ($-q_{LAC}/q_{GLC}$). Este valor permite

visualizar la utilización de la fuente de carbono en la fermentación láctica, teniéndose un valor máximo teórico de 2. Dado que la fermentación es una forma ineficiente de obtener energía, se considera que valores entre 0 y 1,5 son mejores en términos del estado metabólico del cultivo.

3.2.4. Alimentación para Pseudoperfusión

A partir de las tasas de consumo o producción de cada metabolito, se calculó la concentración requerida para poder alimentar la pseudoperfusión a una tasa de 0,1 [vvd] mediante la ecuación:

$$C_a = \frac{X(t_{i+1}) \cdot q_C(t_i) \cdot (t_{i+1} - t_i)}{V_a(t_i)}$$

Donde:

C_a : Concentración del metabolito C en la alimentación.

$X(t_{i+1})$: Concentración de biomasa X estimada para el tiempo t_{i+1} .

$q_C(t_i)$: Tasa específica de consumo o producción del metabolito C en el tiempo i .

$V_a(t_i)$: Volumen alimentado en el tiempo i .

Se estableció como punto de referencia el tiempo de cultivo en el que se tiene una densidad de $7,0 \cdot 10^6$ [cells/ml], debido a que corresponde a un punto donde las células están creciendo exponencialmente.

Para la elaboración de la alimentación concentrada, se suplementó el medio basal con aminoácidos en forma de la mezcla de aminoácidos no esenciales (MEM NEEA) así como con aminoácidos en su forma de polvo cristalino. Además, se añadió 10 % FBS y glucosa.

3.2.5. Cultivos Mejorados en Pseudoperfusión

Se repitieron los cultivos en pseudoperfusión por duplicado con las mismas condiciones que en los cultivos preliminares, pero utilizando la alimentación diseñada.

Para este caso, se inocularon los *spinner flask* a una concentración inicial de $0,9 \cdot 10^6$ [cells/mL] con células provenientes desde cultivos confluentes en *T-flasks* de 75 [cm²]. La pseudoperfusión se inicia después de 24 [h] y se realiza centrifugando un 10 % del volumen de cultivo, resuspendiendo el *pellet* obtenido en 6 [mL] de alimentación y devolviéndolo al *spinner flask*. La alimentación utilizada fue una mezcla de medio base y alimentación diseñada de manera tal que se evita la acumulación de glucosa en el cultivo.

En cada cambio de medio se guardaron muestras de 1,5 [mL] y se determinó la densidad celular utilizando el método de exclusión por azul tripán en hematocitómetro. El sobrenadante se almacenó a -20°C para análisis posteriores.

1. **Incubación con virus:** A cultivos adherentes con 90 % de confluencia se le cambia el medio agotado por una solución de medio basal suplementado con 10 % FBS y 10 % de solución viral. Se incuba por 5 horas.
2. **Incubación con glucosamina:** Se elimina el medio con solución viral y se lava con PBS. Se incuba con una solución de glucosamina por 20 minutos.
3. **Incubación con cloroquina:** Se elimina la glucosamina y se lava con PBS. Posteriormente, se agrega medio de cultivo con 10 % FBS y 1 % cloroquina, y se incuba por 48 horas.
4. **Pasaje:** Se realiza un pasaje del cultivo con un ratio 1:5 y se deja incubar con medio basal y 10 % FBS. Los cultivos se dejan crecer por 10 días con cambios de medio total cada 48 horas.

Para estudiar el protocolo de infección se llevaron a cabo variaciones de este. Estas fueron:

- **Infección sin reactivos:** Se eliminan la incubaciones con glucosamina y cloroquina.
- **Infección con cloroquina:** Se elimina la incubación con glucosamina.
- **Infección con glucosamina:** Se elimina la incubación con cloroquina.
- **Infección invertida:** Se invierte el orden de las incubaciones con cloroquina y glucosamina.

Para probar posibles mejoras de la productividad específica de PCV2, se realizaron los siguientes experimentos:

- **Hipotermia moderada:** Una vez iniciada la etapa de pasaje, las células se incuban a 34°C en lugar de 37°C.
- **Tratamiento con concanavalina A:** 24 horas antes de iniciar la infección, se agregan 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de concanavalina A al medio de cultivo.

Para llevar a cabo estos protocolos, se realizaron cultivos adherentes de células PK15 en *T-flasks* de 25 [cm^2] con 8 [mL] de medio. Las condiciones de cultivo fueron 5 % CO_2 , 37°C y atmósfera saturada en humedad. La infección de las células se llevó a cabo utilizando una solución de PCV2 que contiene $5 \cdot 10^{10}$ [CAEV/mL] (CAEV = equivalentes a genoma viral).

Para cuantificar el virus producido, se lisaron las células mediante congelamiento a -80°C. Utilizando centrifugación se descartan los restos celulares y el sobrenadante se envía a una empresa externa que mide el material genómico viral utilizando un kit específico en un equipo de qPCR. La densidad celular de cada placa se cuantificó desde un duplicado biológico al que se le realizó conteo de núcleos mediante tinción con cristal violeta.

3.2.8. Infección con PCV2 en Pseudoperfusión

Se llevaron a cabo cultivos en suspensión de células PK15 en *spinner flasks* con 60 [mL] de cultivo efectivo. Las condiciones de cultivo fueron 5 % CO_2 , 37°C, atmósfera saturada en humedad y agitación de 110 [rpm]. El medio utilizado fue una mezcla DMEM/F12 1:1 suplementada con 5 %

FBS y antioxidantes (ver composición en Anexo 2).

La infección base se realizó cuando el cultivo alcanza las $1,2 \cdot 10^6$ [cells/mL] según el siguiente procedimiento:

1. **Incubación con virus:** Se realiza un cambio de medio por uno que contiene 10 % FBS y 10 % de solución viral. Se incuba por 10 ciclos con 28 minutos sin agitar y 2 minutos de agitación a 110 [rpm].
2. **Incubación con glucosamina:** Se traspasa el cultivo a dos tubos Falcon de 50 [mL] y se centrifugan. Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en una solución de glucosamina por 15 minutos, para luego ser centrifugadas por 5 minutos.
3. **Incubación con cloroquina:** Se elimina la glucosamina y se resuspenden las células en PBS. Se vuelven a centrifugar y se pasan a *spinner flasks* con 60 [mL] de cultivo con 5 % FBS y 1 % cloroquina. Se incuba por 48 horas.
4. **Pasaje:** Los cultivos se traspasan a *spinner flasks* con 250 [mL] de medio basal con 5 % FBS. Se dejan crecer por 10 días con cambios de medio total cada 48 horas.

La infección en alta densidad se realizó sobre un cultivo de pseudoperfusión iniciado a las $1,2 \cdot 10^6$ [cells/mL]. La alimentación utilizada corresponde a la diseñada anteriormente y el protocolo de infección se lleva a cabo cuando el cultivo alcanza $7,0 \cdot 10^6$ [cells/mL] siguiendo el mismo procedimiento que para la infección base.

Las células se lisan mediante congelamiento a -80°C , se descartan los restos celulares mediante centrifugación y el sobrenadante se utiliza para medir material genómico viral utilizando un kit específico en un equipo de qPCR. Las densidad celular se cuantificó mediante tinción con azul de tripán en hematocitómetro.

3.2.9. Análisis de Agitación

Para obtener los valores de agitación propuestos para cada una de las escalas en el proceso se utilizaron la conservación de los parámetros de potencia por unidad de volumen, velocidad tangencial al agitador y número de Reynolds en el cultivo. En el primer caso se tiene:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2$$

$$\left(\frac{N_p \rho N^3 D_i^5}{\pi H D_T^2}\right)_1 = \left(\frac{N_p \rho N^3 D_i^5}{\pi H D_T^2}\right)_2$$

En este punto se asume que se conservará el régimen turbulento (N_p constante), que la densidad del cultivo no varía y que la razón entre altura, diámetro del agitador y diámetro del biorreactor se conserva. Con esto:

$$N_2 = N_1 \sqrt[3]{\left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)^2}$$

Análogamente, para la velocidad tangencial al agitador:

$$\tau_1 = \tau_2$$

$$(\pi N D_i)_1 = (\pi N D_i)_2$$

$$N_2 = N_1 \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)$$

Y para el número de Reynolds, asumiendo una viscosidad constante:

$$R_{e_i1} = R_{e_i2}$$

$$\left(\frac{\rho N D_i^2}{\mu}\right)_1 = \left(\frac{\rho N D_i^2}{\mu}\right)_2$$

$$N_2 = N_1 \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)^2$$

3.2.10. Análisis de Aireación

El balance entre OTR y OUR corresponde a:

$$K_L a(c^* - c) \cdot V = \frac{P}{RT}(Q_{in} \cdot Y_{O_2in} - Q_{out} \cdot Y_{O_2out})$$

Para resolver el balance se tomaron los siguiente supuestos:

- El flujo de aire que sale del biorreactor es el mismo que ingresa ($Q_{in} = Q_{out}$).
- La fracción de oxígeno en el aire es 21 % ($Y_{O_2in}=0,21$).
- El gas de salida tiene una fracción de oxígeno de 19 % ($Y_{O_2out}=0,19$) [19].
- La saturación de oxígeno para las condiciones de operación es 0,24 [mM] [19].

- El oxígeno disuelto en el biorreactor corresponde al 30 % de saturación.
- La concentración de equilibrio en la interfase se puede aproximar por la concentración de oxígeno en la salida [19].

Estas suposiciones son válidas para biorreactores de menos de 500 [L] con células mamíferas y se basan en valores típicos encontrados para diversos procesos [6, 19]. De esta forma el balance se puede escribir como:

$$K_L a(c^* - c) = \frac{Q}{V} \frac{P}{RT} (Y_{O_2in} - Y_{O_2out})$$

$$K_L a(0,22 - 0,076)[mmol/L] \frac{1[mol]}{1000[mmol]} = \frac{Q}{V} \cdot \frac{1[atm]}{0,082[\frac{atm \cdot L}{mol \cdot K}]310[K]} (0,21 - 0,19)$$

Capítulo 4 : Resultados y Discusiones

4.1. Estudio del Cultivo en Pseudoperfusión

4.1.1. Cultivos Preliminares

La curva de crecimiento obtenida para una pseudoperfusión a 1[vvd] se muestra en la Figura 4.1. La biomasa (en negro) muestra una fase lag extensa de 75 [hrs] seguida de un crecimiento exponencial del cultivo hasta que se alcanza una densidad cercana a las $10 \cdot 10^6$ [cells/mL] a las 220 [hrs] (6 a 7 veces lo alcanzado sin perfusión). Durante este periodo, la viabilidad del cultivo (en rojo) se mantiene sobre el 95 %, lo que es indicio de un cultivo saludable. Posterior a las 220 [hrs] de cultivo se observa una disminución abrupta de la biomasa acompañada de una caída en los niveles de viabilidad.

La concentración de lactato (en verde) aumenta durante las primeras 100 [hrs] de cultivo hasta estabilizarse alrededor de los 16 [mM] hasta las 220 [hrs], donde este metabolito se comienza a consumir. Por otro lado, la glucosa se consume hasta las 75 [hrs], cuando se estabiliza alrededor de los 7 [mM] para luego terminar agotándose después de las 200 [hrs].

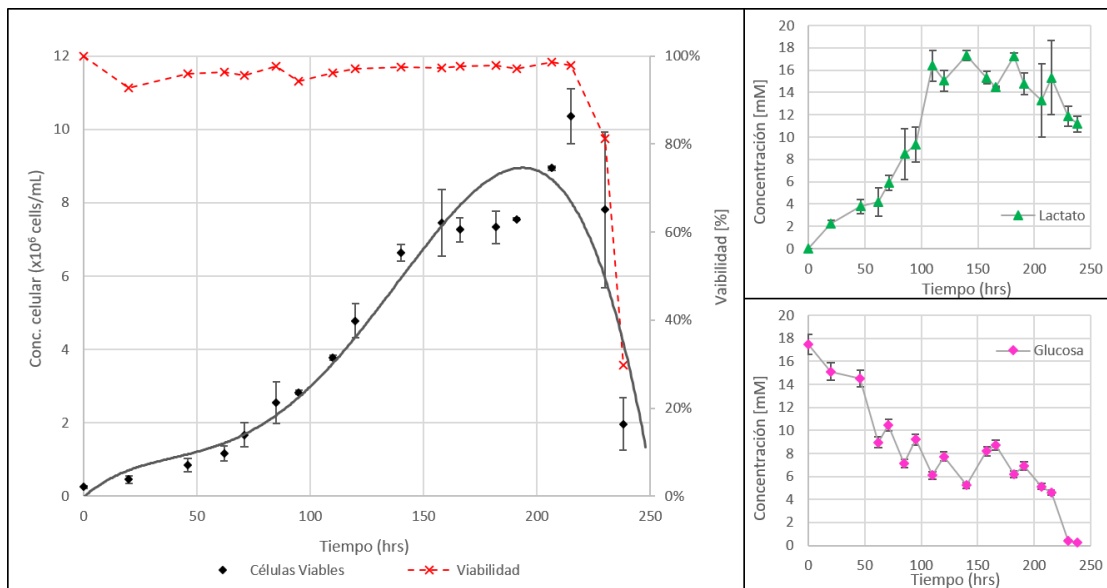


Figura 4.1: Curva de crecimiento inicial en pseudoperfusión, donde se presenta el promedio de un duplicado biológico. Se muestran valores para densidad celular (◆), viabilidad (×), glucosa (◆) y lactato (▲).

Los parámetros característicos del cultivo se pueden ver en la Tabla 4.1. La velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación se encuentran dentro de los rangos reportados en experimentos previos, mientras que la razón entre las tasas de producción de lactato y de consumo de glucosa se encuentra dentro de un rango normal para un cultivo no optimizado.

Tabla 4.1: Parámetros de cultivo para pseudoperfusión inicial.

Parámetro	Valor
μ_{max}	0,017 [h ⁻¹]
t_d	40,8[h]
BM_{max}	10·10 ⁶ [cells/mL]
$-q_{LAC}/q_{GLC}$	1,33

Las concentraciones medidas a lo largo del cultivo para los 17 aminoácidos estudiados se pueden observar en la Figura 5.1 del Anexo 3. Desde estos datos se puede observar que el glutamato es el principal aminoácido que se acumula en el medio de cultivo, mientras que prolina y arginina se acumulan durante las primeras 180 horas, para consumirse en la etapa final. El análisis de las tasas específicas (Anexo 3) muestra que estos tres metabolitos no se acumulan producto de exceso en la alimentación, sino que están siendo producidos por las células.

Por otro lado, los aminoácidos treonina, lisina, isoleucina, glicina y leucina muestran una tendencia a consumirse al inicio del cultivo, para luego acumularse y finalmente estabilizarse en torno a un valor constante. El resto de los aminoácidos mantienen una concentración relativamente estable durante todo el cultivo. Las tasas específicas muestran que estos aminoácidos se están consumiendo en la etapa exponencial, por lo que se requiere aumentar sus concentraciones para poder llevar a cabo cultivos con una baja tasa de perfusión.

La figura 4.2 muestra el comportamiento de tres aminoácidos específicos (glutamato, glutamina y treonina), que presentan comportamientos diferentes a lo largo del cultivo.

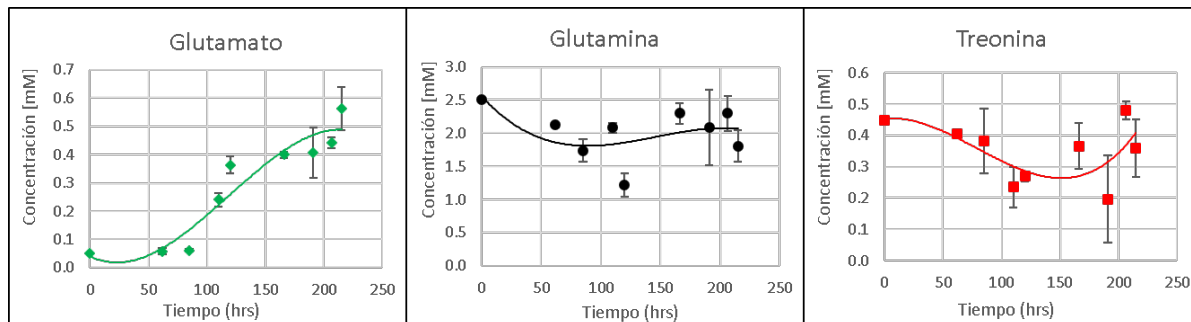


Figura 4.2: Concentración de aminoácidos con diferentes comportamientos durante pseudoperfusión inicial. Resultados de duplicado biológico para glutamato (◆), glutamina (●) y treonina (■).

4.1.2. Alimentación para Cultivos a Baja Perfusión

Si bien la pseudoperfusión es exitosa en el aumento de biomasa, la alta tasa de perfusión utilizada no es aplicable en un contexto industrial debido a los grandes volúmenes de medio necesarios. Los valores tradicionales de tasas de perfusión corresponde a menos de un 20 % del volumen total por día.

Dado lo anterior, se procedió a diseñar una alimentación concentrada utilizando las tasas de consumo calculadas, siguiendo la metodología presentada en la sección 3.2.4. Para prepararla, se utilizó medio basal con 10 % FBS y se le añadió un 5 % de MEM NEAA, lo cual aporta glicina, alanina, aspartato, glutamato, asparragina, prolina y serina. La glucosa y el resto de los aminoácidos se agregaron directamente desde reactivos en polvo.

El hecho de que la alimentación contenga MEM NEAA tiene como consecuencia que la composición real difiera del ideal calculado, particularmente para los aminoácidos no esenciales que se producen en cultivo. Se espera que la adición de un exceso de dichos aminoácidos desincentive su producción, mejorando la eficiencia del uso de recursos por parte de las células. La composición de la alimentación utilizada se muestra en la tabla 4.2, donde la razón frente a medio base se define como la concentración en la alimentación diseñada dividida por la concentración en el medio basal.

Tabla 4.2: Composición de glucosa y aminoácidos en la alimentación concentrada.

Metabolito	Concentración alimentación [mM]	Razón frente a medio base
Glucosa	108,11	6,18
Alanina	0,54	10,95
Cisteína	0,59	2,93
Serina	0,74	2,95
Glicina	0,74	2,95
Lisina	1,57	3,15
Leucina	1,49	3,29
Glutamina	9,40	3,76
Histidina	0,34	2,25
Asparragina	0,49	9,75
Isoleucina	1,42	3,40
Metionina	0,37	3,16
Treonina	2,34	5,21
Tirosina	0,60	2,79
Fenilalanina	0,55	2,56
Prolina	0,64	4,28
Arginina	0,70	1,00
Glutamato	0,55	10,95

4.1.3. Cultivos Mejorados en Pseudoperfusión

La curva de crecimiento mejorada utilizando 0,1[vvd] como tasa de perfusión se muestra en la Figura 4.3. Se puede observar que la utilización de un inóculo entre 4 y 5 veces mayor permitió saltarse la fase lag, mientras que la concentración máxima de células se alcanza después de las 200 [hrs] cerca de las $12 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Sin embargo, la viabilidad del cultivo disminuye después de que se alcanzan $10 \cdot 10^6$ [cells/mL], hasta valores menores al 60 % al final del cultivo. La concentración de lactato aumenta durante las primeras 100 [hrs] de cultivo hasta estabilizarse alrededor de los 14 [mM] por un período de 50 [hrs] para consumirse hacia el final del cultivo.

Dado que la alimentación se diseñó para un punto avanzado del cultivo, se mezcló en proporciones específicas con medio base según la concentración de glucosa medida al momento de realizar cada adición de medio, de modo de nunca superar los 20 [mM] en cultivo. Siguiendo esta estrategia de alimentación, la glucosa se mantiene relativamente estable en torno a los 12 [mM] hasta que el cultivo comienza a perder viabilidad, punto desde el cual se comienza a acumular. El alto valor del punto estable de glucosa, en comparación con el caso anterior, sugiere que esta se está sobrealimentando.

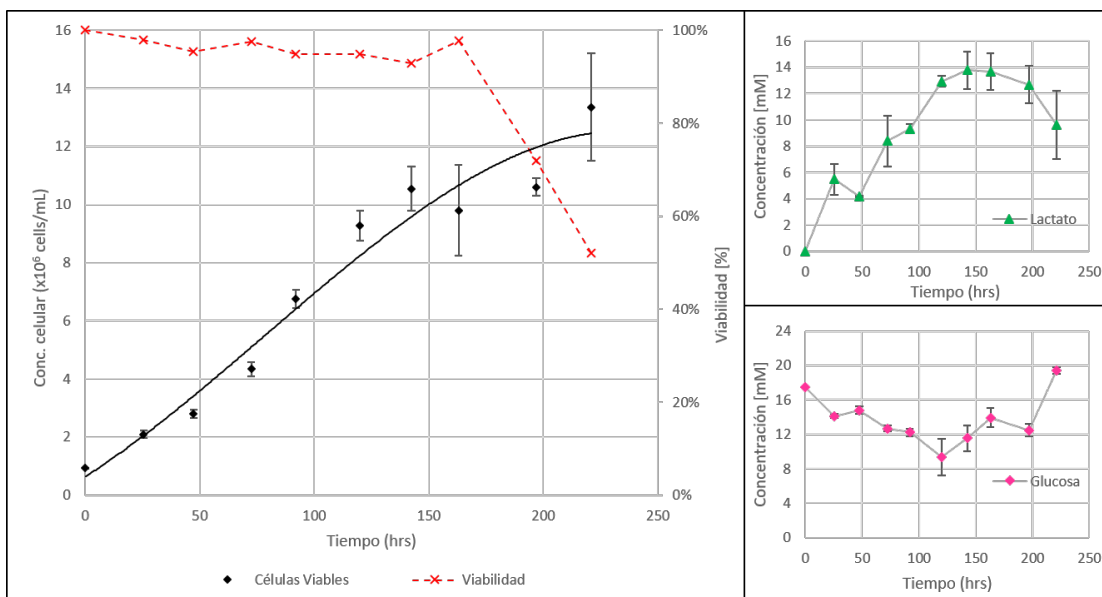


Figura 4.3: Curva de crecimiento mejorada en pseudoperfusión, donde se presenta el promedio de un duplicado biológico. Se muestran valores para densidad celular (◆), viabilidad (×), glucosa (◆) y lactato (▲).

La alimentación diseñada se debe mezclar con medio basal para evitar la acumulación de glucosa cuando se tienen una densidad celular menor a la utilizada para calcular la composición de esta. Así, se utiliza solo un tercio de alimentación diseñada (y dos tercios de medio basal) cuando el cultivo tiene una densidad menor a $5 \cdot 10^6$ [cell/mL], lo que se aumenta a un medio antes de alcanzar $9 \cdot 10^6$ [cell/mL]. Solo a partir de este punto se utiliza un flujo completo de alimentación diseñada como ingreso al cultivo, para mantener el valor de glucosa en el cultivo relativamente constante.

Los parámetros del cultivo se pueden ver en la Tabla 4.3. Por un lado, se observa una mejora menor en la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de las células con respecto al caso inicial. Por otro lado, la razón entre las tasas de producción de lactato y de consumo de glucosa corresponde a un tercio del caso inicial, mostrando que la alimentación diseñada y el régimen de operación propuesto tienen como consecuencia una mejora considerable en el estado metabólico general del cultivo.

Tabla 4.3: Parámetros de cultivo para pseudoperfusión mejorada.

Parámetro	Valor
μ_{max}	0,019 [h ⁻¹]
t_d	36,5 [h]
BM_{max}	13·10 ⁶ [cells/mL]
$-q_{LAC}/q_{GLC}$	0,44

Las concentraciones medidas a lo largo del cultivo para los 20 aminoácidos estudiados se pueden observar en la Figura 5.2 del Anexo 4. Desde estos datos se puede observar que la mayoría de los aminoácidos se acumulan hacia el final del cultivo, aunque levemente por sobre la concentración inicial. Es posible notar que cisteína y asparragina se acumulan hasta alcanzar una concentración varias veces la presente en el medio basal. De igual manera, se puede observar que los aminoácidos metionina y arginina prácticamente se agotan en el cultivo.

El análisis de las tasas específicas (Anexo 4) muestra que cisteína tiene una tasa de consumo menor que en el caso original, lo que lleva a su acumulación. Por otro lado, asparragina ha pasado de ser consumida en la pseudoperfusión inicial a producirse en este cultivo; lo contrario ocurre con el aminoácido glutamato, que pasa de ser producido a ser consumido. La figura 4.2 muestra el comportamiento de tres aminoácidos específicos (glutamato, glutamina y treonina), que presentan comportamientos diferentes a lo largo del cultivo.

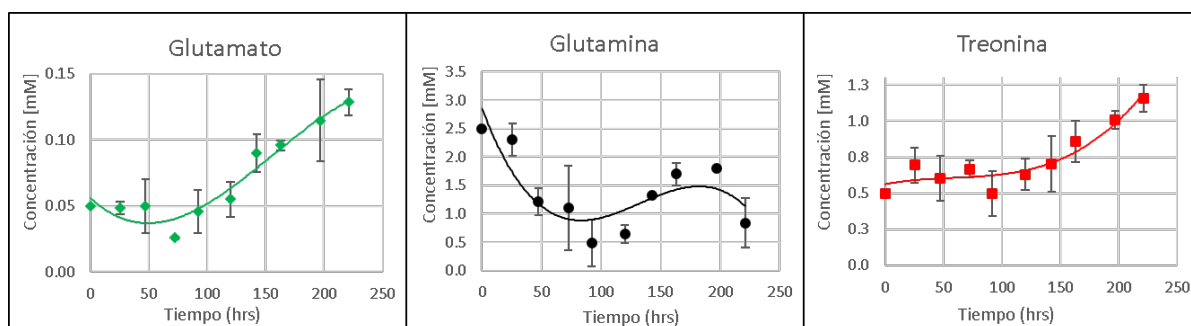


Figura 4.4: Concentración de ciertos aminoácidos durante pseudoperfusión mejorada. Resultados de duplicado biológico para glutamato (◆), glutamina (●) y treonina (■).

4.1.4. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA)

En la Figura 4.5 se puede observar la distribución de flujos resultante a partir de las tasas específicas de producción/consumo calculadas en la sección anterior para el cultivo en pseudoperfusión en los casos en que se alimenta con medio base y con una alimentación diseñada. Se observan cambios significativos en lo que respecta a la utilización de la glucosa y la glutamina en el metabolismo energético y para la producción de biomasa.

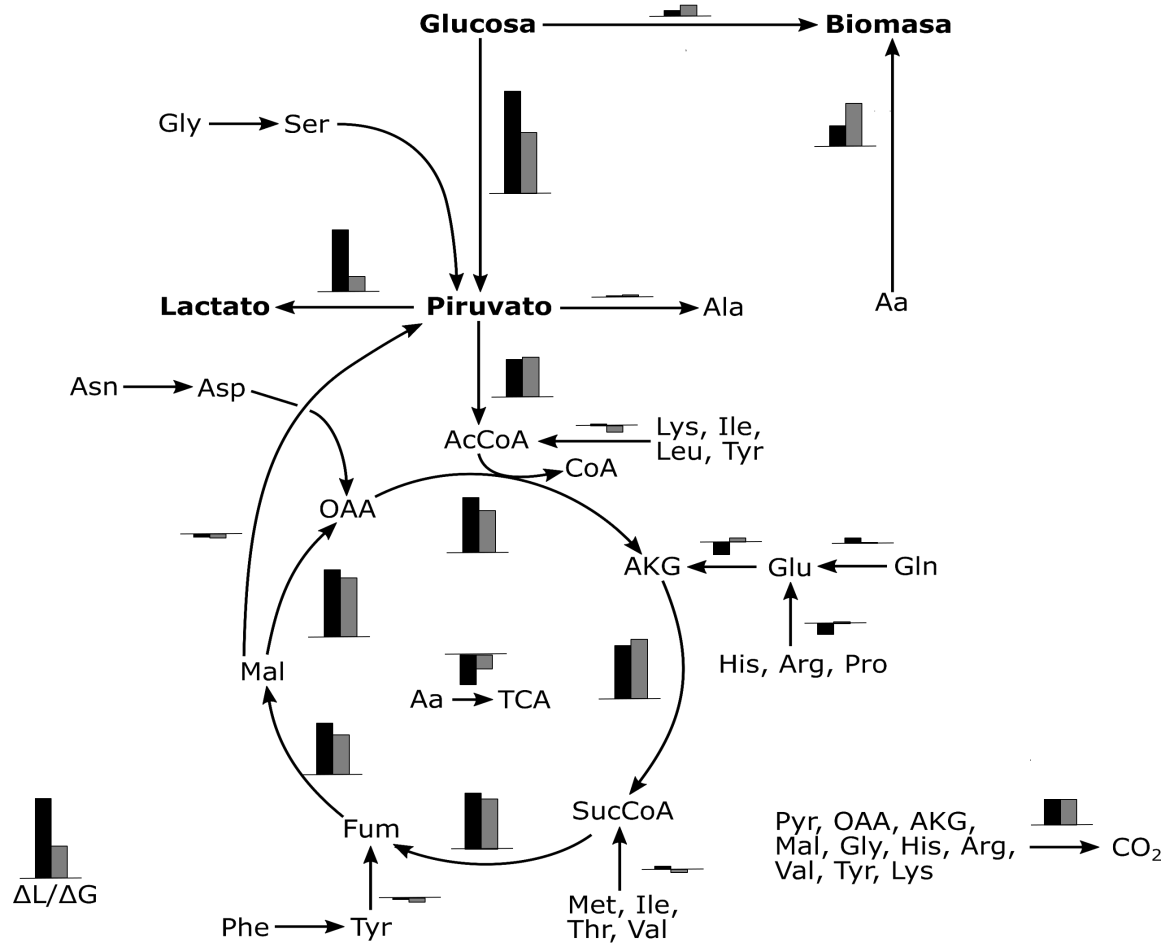


Figura 4.5: Distribución de flujos metabólicos en la pseudoperfusión original (negro) y mejorada (gris).

Con respecto al metabolismo de la glucosa, se observa que al utilizar la alimentación diseñada, disminuye el ingreso de glucosa a la etapa de glicólisis en alrededor de un 40 %, lo que se puede asociar a una utilización más controlada de la fuente principal de carbono. Al mismo tiempo, el flujo de lactato producido disminuye significativamente, lo que se refleja también en un cambio de la razón $-q_{LAC}/q_{GLC}$.

El cambio en la producción de lactato tiene como consecuencia un leve aumento del flujo de ingreso de piruvato al ciclo de TCA, a pesar del menor flujo de glucosa. Simultáneamente, se observa un aumento en el flujo de glucosa que se destina a la producción de biomasa.

Por otro lado, el metabolismo de glutamina muestra una disminución de la utilización de este aminoácido para la síntesis de glutamato. A la vez, el flujo de glutamato a α -cetoglutarato se invierte, pasando desde una producción de este aminoácido a su ingreso al ciclo de Krebs. Este comportamiento permite explicar por qué disminuye significativamente la acumulación de glutamato cuando se utiliza la alimentación diseñada.

Este cambio en el metabolismo tiene como consecuencia una fuerte disminución de los flujos de aminoácidos totales que salen del ciclo del TCA. En paralelo, se observa un incremento del flujo de aminoácidos total que está disponible para la producción de biomasa.

A pesar de lo anterior, existe un aumento en los flujos en el sentido de producción de algunos aminoácidos (e.g. metionina), generando un ineficiencia en el metabolismo que podría explicarse por una deficiencia de dichos aminoácidos en la alimentación.

En términos generales, la utilización de la alimentación diseñada parece tener como efecto una mejora en el desempeño de los metabolismos de glucosa y glutamina, lo que se traduce en un menor flujo de lactato, una menor salida neta de aminoácidos desde el ciclo de Krebs y un aumento en los flujos de aminoácidos y glucosa destinados a la producción de biomasa. Un ajuste más fino de la alimentación con respecto a aminoácidos distintos a glutamina y glutamato podría ayudar a mejorar aún más la eficiencia del metabolismo de las células en cultivo.

Los valores numéricos de los flujos metabólicos obtenidos se encuentra en la Tabla 5.3 del Anexo 3 y en la Tabla 5.5 del Anexo 4 para el experimento inicial y el mejorado, respectivamente.

4.1.5. Propuesta Final de Medio para Alimentación

Utilizando las nuevas tasas de producción y consumo calculadas, se determina una nueva composición para la alimentación que se presenta en la Tabla 4.4, donde la razón frente a medio base se define como la concentración en la alimentación diseñada dividida por la concentración en el medio basal. Utilizando un enfoque de modificaciones más conservador, los valores recomendados son el promedio entre los valores calculados y los utilizados anteriormente.

Se puede observar que la recomendación para la mayoría de los componentes es disminuir su concentración, con la excepción de metionina y arginina, que eran los que mostraban una tendencia a agotarse en el cultivo. El proceso de mejora de la alimentación se puede seguir repitiendo de manera iterativa siguiendo el mismo procedimiento.

Tabla 4.4: Composición de glucosa y aminoácidos propuesta para alimentación mejorada.

Metabolito	Concentración alimentación [mM]	Razón frente a medio base	Razón original
Glucosa	97,82	5,64	6,18
Alanina	0,46	9,19	10,95
Cisteína	0,46	2,30	2,93
Serina	0,16	0,65	2,95
Glicina	0,25	1,00	2,95
Lisina	1,18	2,38	3,15
Leucina	0,95	2,10	3,29
Glutamina	7,60	3,04	3,76
Histidina	0,20	1,31	2,25
Aspargina	0,23	4,51	9,75
Isoleucina	0,84	2,01	3,40
Metionina	0,48	4,19	3,16
Treonina	1,18	2,63	5,21
Tirosina	0,25	1,17	2,79
Fenilalanina	0,24	1,10	2,56
Prolina	0,34	2,25	4,28
Arginina	1,15	1,64	1,00
Glutamato	0,35	7,04	10,95

4.2. Estudio de la Producción de PCV2

4.2.1. Pruebas del Protocolo Original de Infección

En la Figura 4.6 se pueden observar los valores de equivalentes genómicos virales por célula (CAEV/cell) obtenidos para diferentes variaciones del protocolo original de infección. La empresa ha reportado que la infección con PCV2 tiene una alta variabilidad que se encuentra en torno al orden de magnitud para diferentes experimentos, por lo que se utiliza el caso en el que el cultivo sólo se expone al virus como referencia para comparaciones.

Los resultados muestran que el uso combinado de glucosamina y cloroquina (Gmn+/Clq+) como facilitadores de la infección permite aumentar la cantidad de virus total presente en alrededor de 6 veces. La modificación del orden en que se utilizan estos reactivos (Clq+/Gmn+) aumenta la cantidad de virus producida alrededor de 9 veces, aunque la alta desviación estándar y el bajo número de repeticiones (n=2) impide señalar si este cambio es significativo.

El uso de glucosamina (Gmn+) o cloroquina (Clq+) por sí solas aumenta entre 9 o 10 veces la cantidad de virus producido, lo que permite cuestionar la pertinencia del uso conjunto de estos reactivos. Sin embargo, el bajo número de repeticiones y la alta desviación de los datos experimentales impiden asegurar que estos resultados sean significativos, por lo que se recomienda repetir los experimentos un mayor número de veces (n>5) y llevar a cabo un análisis estadístico más acabado.

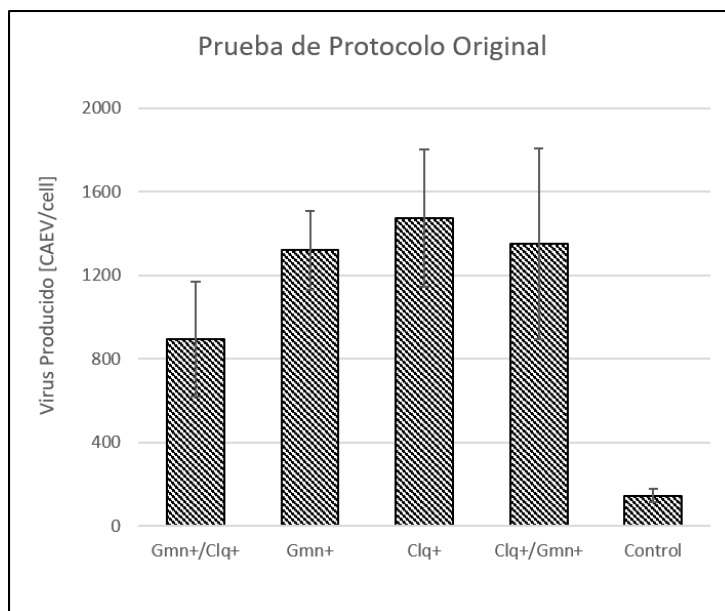


Figura 4.6: Equivalentes virales por célula producidos en condiciones basales de infección.

Los resultados presentados permiten señalar que el uso de glucosamina y cloroquina permite mejorar la producción de PCV2 en cultivos de PK15. Si estos resultados se comprobaran para un número más grande de casos, se podría explorar la eliminación de una de las etapas de infección, lo que mejoraría la economía del proceso en términos de tiempo, costos de reactivos y facilidad de la operación.

4.2.2. Infección con Concanavalina A

Los resultados obtenidos para infecciones con y sin preincubación con concanavalina A se muestran en la Figura 4.7 en unidades de equivalentes virales por célula (CAEV/cell). La preincubación aumenta la cantidad de virus producida por el cultivo alrededor de 2,4 veces, mostrando potencial para mejorar la productividad específica del proceso mediante la adición del reactivo al medio de cultivo 24 horas previas a la infección.

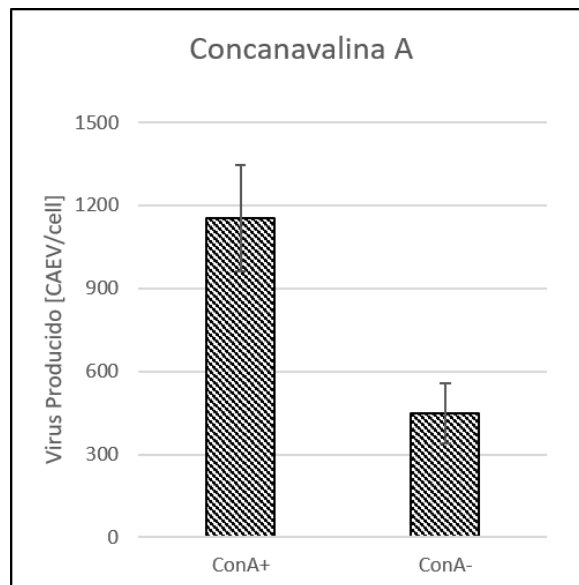


Figura 4.7: Equivalentes virales por célula producidos con y sin preincubación con concanavalina A.

4.2.3. Infección en Hipotermia Moderada

La Figura 4.8 muestra los valores de equivalentes virales por célula (CAEV/cell) para infecciones incubadas a temperatura normal (37°C) e hipotermia moderada (34°C). Se puede ver un aumento de alrededor de 3,2 veces la cantidad de virus producida al disminuir la temperatura de cultivo.

El resultado obtenido permite señalar que una etapa de hipotermia moderada podría aumentar la productividad específica de PCV2 en cultivos de PK15. Un hecho relevante con respecto a este resultado es que la temperatura utilizada se encuentra en lo más alto del rango de temperaturas para cultivos de células mamíferas en hipotermia, por lo que existe el potencial de que al disminuir aún más la temperatura (por ejemplo, 32°C o 30°C) aumente aún más la productividad.

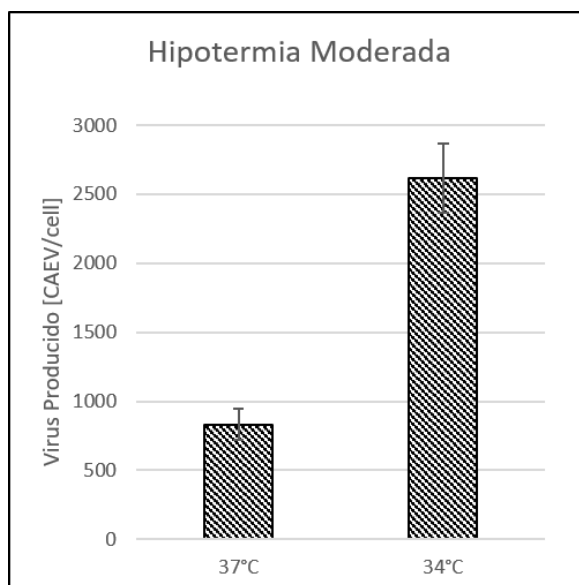


Figura 4.8: Equivalentes virales por célula producidos a 37°C y 34°C.

4.2.4. Infección en Pseudoperfusión

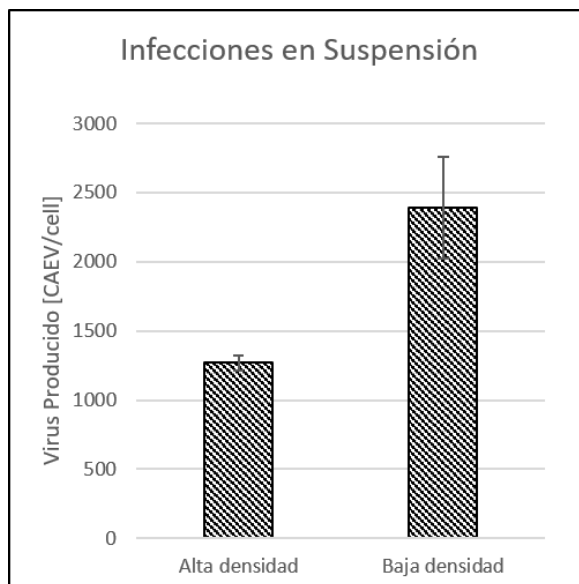


Figura 4.9: Equivalentes virales por célula producidos en cultivos a baja y alta densidad.

La Figura 4.9 muestra los equivalentes virales por célula (CAEV/cell) obtenidos para infecciones realizadas en cultivos en suspensión con alta densidad celular ($7,0 \cdot 10^6$ [cells/mL]) operando en pseudoperfusión y baja densidad celular ($1,2 \cdot 10^6$ [cells/mL]) operando en batch. Los resultados presentados corresponden a muestras obtenidas en el momento posterior a la infección con PCV2, antes del pasaje e incubación por 10 días de los cultivos.

Se puede observar que el cultivo a baja densidad tiene una productividad específica de casi dos

veces la obtenida en el cultivo a alta densidad. Esta disminución en la productividad de virus está reportada para otros cultivos y se atribuye en parte a los cambios abruptos en la composición del medio de cultivo y a las diferencias en el estado metabólico celular.

A pesar de este resultado, la mayor cantidad de células obtenidas por perfusión compensa esta pérdida en productividad. Se tiene que un cultivo de 10 [L] en modo batch tendrá una cantidad de células totales en torno a $1,5 \cdot 10^{10}$ [cells], mientras que en modo perfusión se espera obtener alrededor de $10 \cdot 10^{10}$ [cells] en el mismo volumen. Considerando la productividad específica observada en este experimento, se pueden obtener un total de $3,75 \cdot 10^{13}$ [CAEV] en baja densidad y $12,5 \cdot 10^{13}$ [CAEV] en alta densidad, lo que supone una productividad de equivalentes virales de 3,33 veces mayor para los cultivos en alta densidad.

Por otro lado, si se implementan modificaciones como hipotermia moderada o preincubación con concanavalina A, se puede aumentar aún más el número de equivalentes virales producidos.

Finalmente, es esperable que en el ambiente controlado de un biorreactor con perfusión a una tasa constante se pueda mitigar parcialmente las causas de la disminución de productividad, lo que se debe verificar durante las pruebas en etapa piloto.

4.3. Análisis para el Escalamiento

4.3.1. Tren de Inoculación

Para iniciar el proceso productivo, se deben obtener células desde el banco de trabajo destinado para estos propósitos, el cual debe cumplir con las recomendaciones generales que permitan mantener una alta viabilidad al momento de descongelar las células. El número de crioviales requeridos será tal que se obtengan 5 millones de células totales para inocular una placa de 75 [cm²] a una concentración de $0,2 \cdot 10^6$ [cells/mL].

El cultivo en placa se mantendrá hasta alcanzar una concentración de $0,8 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Con esta cantidad de células se inoculará un *spinner flask* de 100 [mL] a una concentración de $0,2 \cdot 10^6$ [cells/mL], el cual se mantendrá durante 80 horas o hasta alcanzar una concentración de $1,0 \cdot 10^6$ [cells/mL].

Las células obtenidas se utilizarán para inocular un biorreactor de 500 [mL] a una concentración de $0,2 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Este cultivo se mantendrá durante 80 [hrs] o hasta alcanzar una concentración de $1,0 \cdot 10^6$ [cells/mL], punto en el que se utilizará para inocular un biorreactor de 2,5[L] a una concentración de $0,2 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Este último biorreactor tiene equipada una unidad de separación para realizar cultivo en modo perfusión.

En este último biorreactor se dejarán crecer las células hasta alcanzar una concentración de $1,2 \cdot 10^6$ [cells/mL], momento en el que se iniciará la perfusión a una tasa de 0,1 [vvd] utilizando la alimentación diseñada en la sección 4.1.5 de este trabajo. Para evitar la acumulación de glucosa, se debe mezclar la alimentación diseñada con medio basal en una proporción que se modifica en el tiempo, de acuerdo a los criterios que se discutirán en la sección 4.3.4 Análisis de Instrumentación y Control.

El cultivo se mantendrá operando en modo perfusión hasta alcanzar una concentración de $7,0 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Considerando las velocidades específicas de crecimiento medidas para la línea celular, se estima que el tiempo total necesario para alcanzar las células requeridas para infectar es de 420 [hrs]. Un diagrama del tren de inoculación se muestra en la figura 4.10, mientras que un resumen de las etapas se observa en la Tabla 4.5.

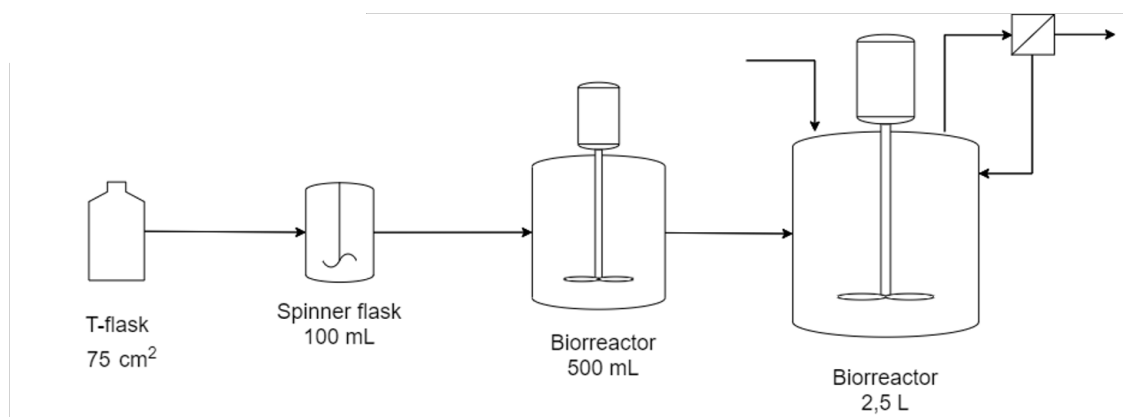


Figura 4.10: Diagrama del tren de inoculación propuesto para el proceso

Tabla 4.5: Resumen de cultivos para el tren de inoculación

Equipo	Volumen	Modo de Operación	Densidad inicial ·10 ⁶ [cells/mL]	Densidad final ·10 ⁶ [cells/mL]	Tiempo [hrs]
<i>T-flask</i>	25 [mL]	Batch	0,2	0,8	70
<i>Spinner flask</i>	100 [mL]	Batch	0,2	1,0	80
Biorreactor	500 [mL]	Batch	0,2	1,0	80
Biorreactor	2,5 [L]	Perfusión	0,2	7,0	190

4.3.2. Producción de PCV2

Para este proceso se realizarán múltiples cambios de medio y transferencia del cultivo entre diferentes biorreactores, por lo que se necesitarán equipos de separación sólido-líquido. Considerando las características de este proceso, se recomienda la utilización de una centrífuga, ya que este equipo es adaptable para diversos flujos de trabajo, tienen una alta eficiencia de separación y no produce daños en las células en las velocidades de operación típicas utilizadas con células mamíferas. Además, la existencia de modelos de centrífuga con interiores descartables evita la necesidad de la validación de la limpieza y esterilización del equipo.

Considerando que se realizarán cambios de medio y transferencia del cultivo en múltiples puntos del proceso, se requerirán de múltiples equipos de separación o se deberá trasladar un único equipo de separación a diferentes secciones del proceso sin perder la esterilidad. Para lograr esto último se recomienda tomar las siguientes medidas:

- Utilizar tuberías de plástico estériles y descartables para conectar los diferentes equipos.
- Utilizar conectores estériles y de un solo uso para modificar las conexiones existentes. Preferir conectores que no requieran ambiente estéril para ser utilizados.
- Realizar la modificación de conexiones en un área limpia, utilizando vestimenta adecuada y rociando con etanol. Si es posible, realizar las modificaciones en un área estéril.

Si se toman en cuenta estas medidas, todo el proceso de infección se puede llevar a cabo con un único equipo de separación. Las etapas del proceso para la producción corresponden a:

1. Preincubación

24 horas antes de que se alcancen las $7,0 \cdot 10^6$ [cells/mL] en el tren de inoculación (166 horas) se adiciona un concentrado de concanavalina A al cultivo (Figura 4.11). Se sugiere utilizar 25 [mL] de una solución 500 [μ g/mL] de concanavalina A en medio basal.

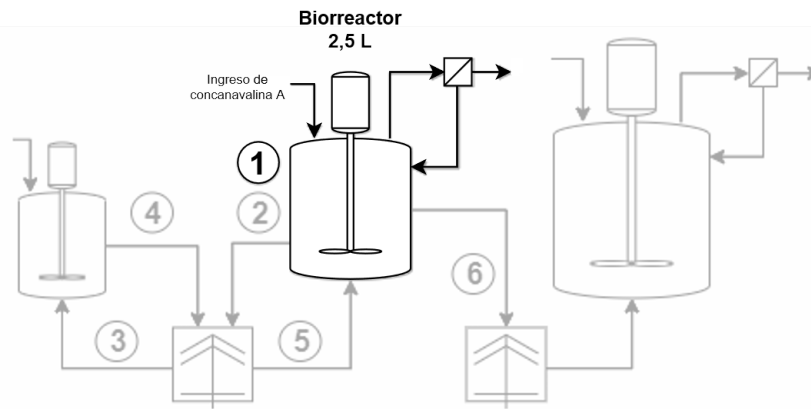


Figura 4.11: Etapa de preincubación con concanavalina A.

2. Incubación con virus

Se realiza un cambio de medio mediante un equipo de separación (diferente al utilizado para la perfusión), donde se concentran las células y se devuelven al biorreactor de 2,5 [L]. Se resuspenden en medio de cultivo con 10 % FBS y 10 % de solución viral, hasta alcanzar el volumen total del equipo (2,5 [L]). Se incuba por un total de 10 ciclos de 2 minutos con agitación y 28 minutos sin agitar (Figura 4.12).

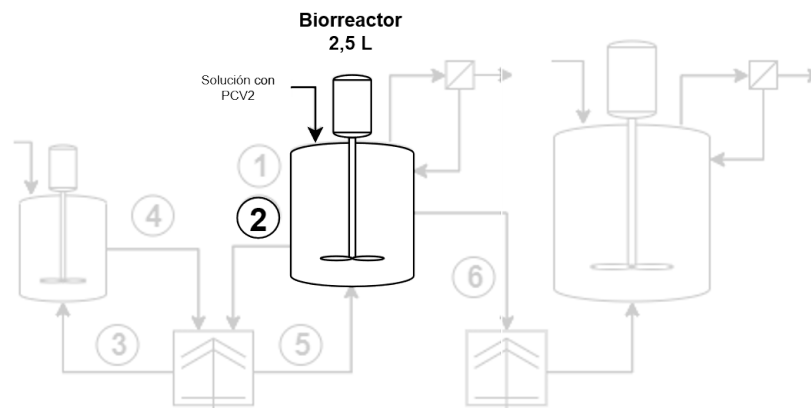


Figura 4.12: Etapa de infección con PCV2.

3. Incubación con glucosamina

Mediante el equipo de separación, las células se concentran y transfieren desde el biorreactor de 2,5 [L] al de 0,5 [L] (Figura 4.13). En este equipo las células se resuspenden en la solución de glucosamina, con suficiente volumen para alcanzar el mínimo de trabajo del biorreactor (100 [mL]). Se incuba por 15 minutos sin agitar.

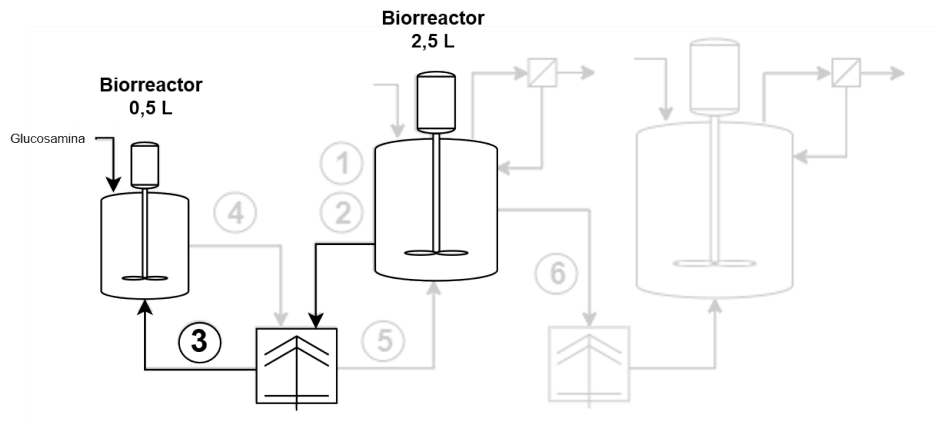


Figura 4.13: Etapa de incubación con glucosamina.

4. Lavado con PBS

Las células se concentran en el equipo de separación y se devuelven al mismo biorreactor, donde se resuspenden en PBS en el volumen total de trabajo (0,5[L]). Se agita hasta que la solución se vuelva homogénea y se pasa a la siguiente etapa (Figura 4.14).

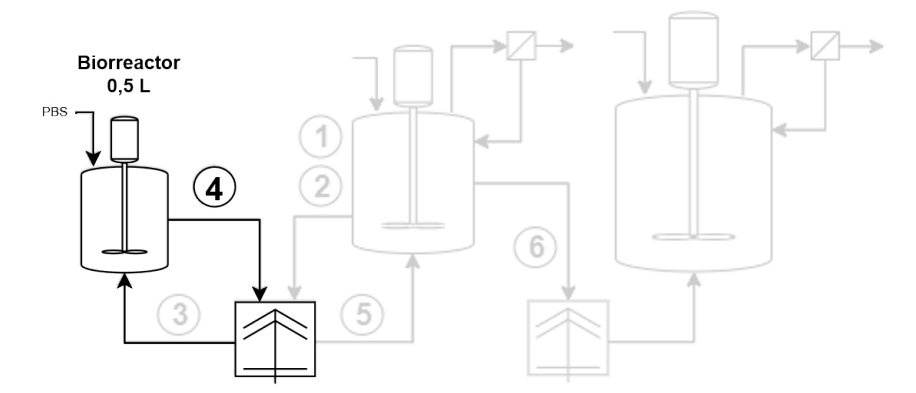


Figura 4.14: Etapa de lavado con PBS.

5. Incubación con cloroquina

Mediante el equipo de separación, se elimina el PBS y se transfieren las células al reactor de 2,5 [L], donde se resuspenden en medio de cultivo con 1 % cloroquina. Se mantiene el cultivo operando en modo perfusión durante 24 horas (Figura 4.15).

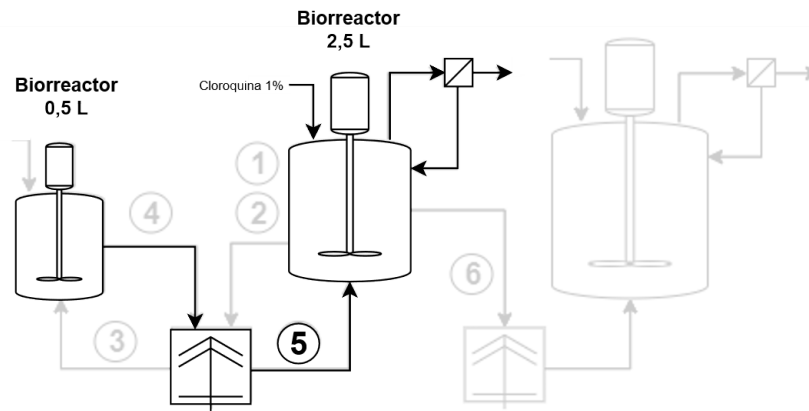


Figura 4.15: Etapa de incubación cloroquina.

6. Pasaje

Finalmente, se concentran las células y se transfiere el cultivo a un biorreactor de 12,5 [L] utilizando el equipo de separación (Figura 4.16). Se resuspenden las células en medio y se mantiene el cultivo operando en modo perfusión a 34°C durante 10 días o hasta que se tenga menos de 80 % de viabilidad.

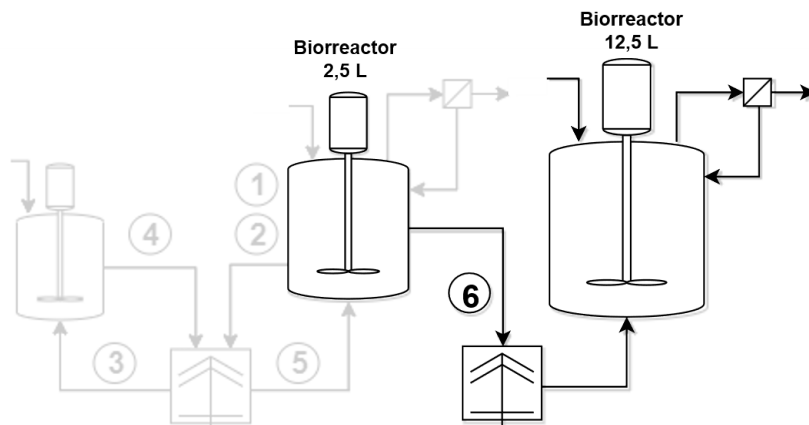


Figura 4.16: Etapa de pasaje y cultivo final.

Al final del proceso se debería tener un cultivo de 12,5 [L] con una densidad celular en torno a los $10 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Si se considera que la productividad específica de PCV2 se encuentra en torno a los 12500 [CAEV/cell], se tiene que los equivalentes virales totales producidos son $1,56 \cdot 10^{14}$ [CAEV], aproximadamente. Considerando que cada dosis de la vacuna tiene en promedio $3,0 \cdot 10^9$ [CAEV], la cantidad de dosis producidas en cada batch sería de alrededor de 50.000.

4.3.3. Análisis de Agitación y Aireación

La Figura 4.17 muestra los valores de agitación estimados para los diferentes biorreactores, basándose en el diámetro de los agitadores de los equipos que comercializa la empresa Applikon. Los valores se obtienen al aplicar los criterios de mantención de la velocidad tangencial de agitación, mantención de la potencia por unidad de volumen y mantención del número de Reynolds sobre los valores trabajados en el *spinner flask* de 60 [mL].

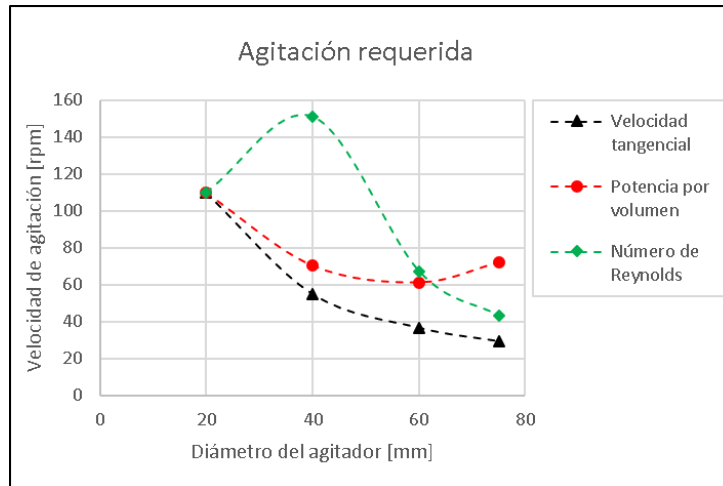


Figura 4.17: Valores de velocidad de agitación para diferentes biorreactores

La Tabla 4.6 presenta un resumen de los resultados que deberán ser validados durante las pruebas piloto del proceso. Se elige un valor intermedio entre los tres criterios utilizados ya que estos buscan mantener aspectos diferentes del cultivo en las nuevas escalas (estrés de corte, mezclado y turbulencia).

Tabla 4.6: Velocidad de agitación para biorreactores

Biorreactor	Diámetro de agitador [mm]	Velocidad de agitación [rpm]
500 [mL]	40	90
2,5 [L]	60	60
12,5 [L]	75	50

Con respecto a la aireación, se utilizaron los datos de saturación de oxígeno en el tiempo para un cultivo batch sin ingreso de aire y sin espacio de cabeza. El ajuste lineal de los datos permite obtener un valor de K_L a correspondiente a $24,36 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ para los cultivos en *spinner flask* (Figura 2.8).

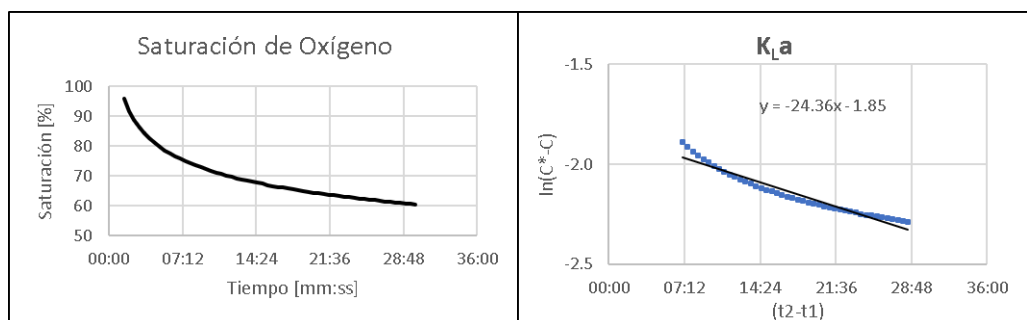


Figura 4.18: Saturación de oxígeno y ajuste para obtención de $K_L a$

Utilizando el balance entre transferencia y consumo de oxígeno se obtuvieron los valores estimados para los flujos de aire requeridos por los biorreactores más grandes que se muestran en la Tabla 4.7. La velocidad superficial obtenida desde estos flujos se encuentra dentro de los rangos reportados por bibliografía [20].

Tabla 4.7: Velocidad de aireación para biorreactores (por balance)

Biorreactor [L]	Flujo de aire [L/h]	Velocidad superficial [cm/h]
2,5	11,2	84,0
12,5	55,8	123,3

4.3.4. Análisis de Instrumentación y Control

La Tabla 4.8 muestra los sensores sugeridos para el monitoreo en línea de las principales variables del proceso en los dos biorreactores de mayor tamaño. Para el biorreactor pequeño (500 [mL]) solo se consideran necesarios los sensores de temperatura y pH, debido a que no se realiza perfusión en este equipo y la aireación ocurre de manera superficial.

Tabla 4.8: Sensores requeridos para biorreactores del proceso

Parámetro	Sensores
Temperatura	Termocupla
pH	Electrodo de pH
Densidad Celular	Sensor de Densidad Óptica
Oxígeno	Sensor Óptico de Oxígeno (Quenching Fluorescente)
Dióxido de Carbono	Electrodo de CO ₂ Disuelto
Glucosa	Electrodo Enzimático

La Tabla 4.9 muestra los objetivos y acciones de control que se deben incluir en los biorreactores de mayor tamaño, donde se espera que los sistemas de control que se incluyen en la mayoría de los biorreactores comerciales sean suficientes para cumplir con estos requerimientos. Si esto no se

observa en la etapa de pruebas en planta piloto, se deben realizar estudios específicos en el área de control de procesos que escapen de los objetivos de esta memoria.

Tabla 4.9: Control propuesto para las variables del proceso

Parámetro	Objetivo de Control	Acción de Control
Temperatura	34°C en biorreactor de 12,5 [L] 37°C en otros biorreactores	Encendido o apagado de la chaqueta eléctrica que cubre la pared del biorreactor
pH	pH = 7,4	Adición de ácido o base
Densidad Celular	Monitoreo	Solo monitoreo
Oxígeno	Saturación de O ₂ igual a 30 %	Aumento o disminución del flujo de aire insuflado
Dióxido de Carbono	Saturación de CO ₂ menor o igual a 15 %	Aumento del flujo de aire insuflado
Glucosa	Concentración de glucosa entre 12 [mM] y 14 [mM]	Aumento o disminución de la razón entre alimentación concentrada y medio basal en el flujo de entrada

Con respecto al pH, el método de adición de ácido o base puede tener como consecuencia un aumento de la osmolaridad del medio de cultivo (sobre 330 [mOsm/L][6]) con efectos nocivos sobre la viabilidad de las células, por lo que si durante las pruebas de planta piloto se observa que el control de pH compromete la viabilidad del cultivo se deberán evaluar métodos alternativos.

Un ejemplo de alternativa corresponde al control basado en el flujo de gases, donde el pH se ajusta al modificar la desorción de CO₂ en el medio cuando se aumenta o disminuye el flujo de aire que se ingresa al equipo. Esto se basa en el equilibrio que se forma con el ácido carbónico que se explicó en el marco teórico (2.7) y en la capacidad del aire pobre en dióxido de carbono de desorber esta especie desde el medio de cultivo.

Con respecto a la densidad celular, los métodos ópticos sufren de problemas de calibración, por lo que las mediciones se deben validar periódicamente frente a métodos fuera de línea como el conteo manual y la exclusión por azul tripán. Esto también permite obtener información sobre viabilidad del cultivo de manera regular.

En el control de O₂ y CO₂ se pueden utilizar sensores adicionales en el gas de salida, lo que permitiría obtener más información sobre el consumo o producción de estos gases, como el cociente respiratorio. Esto es particularmente útil si se observan problemas durante la operación que sean atribuibles a la aireación y se deba modificar el esquema de control asociado a estas variables.

La ventana de control para glucosa se define a partir de los datos obtenidos en laboratorio con el fin de que los resultados sean replicables en planta. Si durante las pruebas piloto se observa que el objetivo de control no se puede cumplir mediante la alimentación diseñada, se debe considerar el aumento de la tasa de perfusión a 0,15 [vvm] o 0,20 [vvm]. Dado que los sensores enzimáticos para glucosa son bastante sensibles, se debe asegurar su calibración con mediciones fuera de línea por lo menos una vez al día.

Capítulo 5 : Conclusiones

Esta memoria buscaba proponer mejoras en la producción de biomasa y de antígenos virales para el proceso de producción de una vacuna veterinaria contra PMWD, así como definir aspectos críticos para el traslado a una escala de planta piloto.

Se logró proponer un diseño de medio de alimentación para un proceso en perfusión que mejora considerablemente la productividad de biomasa del cultivo, pasando de $1,5 \cdot 10^6$ [cells/mL] obtenidas en experimentos anteriores a una densidad de $10 \cdot 10^6$ [cells/mL]. Además, la alimentación diseñada permite el uso de una tasa de recambio baja (10 % del volumen al día), lo que disminuye el gasto de recursos en medio de cultivo.

Por otro lado, se estableció que el uso de hipotermia moderada y concanavalina A pueden mejorar en hasta 2 o 3 veces la productividad específica de antígeno viral. Esto, sumado al aumento de biomasa, permite compensar la disminución de productividad observada en cultivos infectados a una alta densidad celular.

Se propone que nuevas iteraciones de la metodología de diseño de alimentación pueden aumentar aún más la productividad de biomasa. También se considera que se deben realizar estudios más acabados para definir la efectividad del uso conjunto de glucosamina y cloroquina como agentes para la infección viral.

Finalmente, se definieron protocolos para llevar a cabo el proceso en un sistema de biorreactores, partiendo por un tren de inoculación que establece las etapas necesarias para alcanzar el volumen objetivo, seguido de un protocolo para la infección con PCV2, donde se debe utilizar un sistema de tres biorreactores para lograr el proceso con mínima intervención externa.

También se definieron velocidades de agitación y aireación, así como la instrumentación requerida para los equipos. Lo anterior servirá como referencia para montar un proceso piloto que valide los resultados obtenidos en el laboratorio y que funcione como última etapa de pruebas antes de iniciar el proceso productivo.

Anexos

Anexo 1: Reacciones del Modelo Metabólico

Glicólisis y Fermentación Láctica

1. Glucosa \longrightarrow 2 Piruvato
2. Piruvato \longrightarrow Lactato
3. Piruvato \longrightarrow Acetil Coenzima A + CO₂

Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

4. Acetil Coenzima A + Oxalacetato \longrightarrow α -Cetoglutarato + CO₂
5. α -Cetoglutarato \longrightarrow Succinil Coenzima A + CO₂
6. Succinil Coenzima A \longrightarrow Fumarato
7. Fumarato \longrightarrow Malato
8. Malato \longrightarrow Oxalacetato

Metabolismo de Aminoácidos

9. Glutamina \longrightarrow Glutamato + NH₃
10. Glutamato \longrightarrow α -Cetoglutarato + NH₃
11. Malato \longrightarrow Piruvato + CO₂
12. Piruvato + Glutamato \longrightarrow α -Cetoglutarato + Alanina
13. Serina \longrightarrow Piruvato + NH₃
14. 2 Glicina \longrightarrow Serina + NH₃ + CO₂
15. Cisteina \longrightarrow Piruvato + NH₃

16. Aspartato + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + Oxalacetato
17. Asparragina \longrightarrow Aspartato + NH_3
18. Histidina \longrightarrow Glutamato + NH_3 + CO_2
19. Prolina \longrightarrow Glutamato
20. Arginina + α -Cetoglutarato \longrightarrow 2 Glutamato + NH_3 + CO_2
21. Isoleucina + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + Succinil Coenzima A + Acetil Coenzima A
22. Metionina + Serina + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + Cisteina + Succinil Coenzima A
23. Treonina \longrightarrow Succinil Coenzima A + NH_3
24. Valina + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + Succinil Coenzima A + CO_2
25. Fenilalanina \longrightarrow Tirosina
26. Tirosina + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + Fumarato + 2 Acetil Coenzima A + CO_2
27. Lisina + 2 α -Cetoglutarato \longrightarrow 2 Glutamato + 2 Acetil Coenzima A + CO_2
28. Leucina + α -Cetoglutarato \longrightarrow Glutamato + 3 Acetil Coenzima A

Producción de Biomasa

29. 0,038 Glutamina + 0,013 Alanina + 0,007 Arginina + 0,026 Asparragina + 0,001 Cisteina + 0,001 Glutamato + 0,017 Glicina + 0,003 Histidina + 0,008 Isoleucina + 0,013 Leucina + 0,01 Lisina + 0,003 Metionina + 0,006 Fenilalanina + 0,008 Prolina + 0,009 Serina + 0,008 Treonina + 0,004 Tirosina + 0,009 Valina + 0,0213 Glucosa \longrightarrow Biomasa

Anexo 2: Composición del Medio Basal

Tabla 5.1: Composición del medio de cultivo DMEM/F12 1:1

Componentes	Conc. [mM]	Componentes	Conc. [mM]
Aminoácidos		Sales Inorgánicas	
Glicina	0.250	Cloruro de Calcio	1.050
Alanina	0.050	Sulfato Férrico	0.002
Arginina	0.699	Cloruro de Magnesio	0.301
Asparagina	0.050	Sulfato de Magnesio	0.407
Ácido Aspártico	0.050	Cloruro de Potasio	4.155
Cisteína	0.201	Bicarbonato de Sodio	29.000
Ácido Glutámico	0.050	Cloruro de Sodio	120.680
Glutamina	2.500	Fosfato de Sodio Dibásico	0.500
Histidina	0.150	Fosfato de Sodio Monobásico	0.453
Isoleucina	0.416	Sulfato de Cinc	0.002
Leucina	0.451	Otros Componentes	
Lisina	0.499	Ácido Ascórbico	0.110
Metionina	0.116	D-Glucosa	17.500
Fenilalanina	0.215	Etanolamina	1.700
Prolina	0.150	Hipoxantina de Sodio	0.015
Serina	0.250	Ácido Linoleico	0.0002
Treonina	0.449	Ácido Lipoico	0.0005
Triptofano	0.044	Mercaptoetanol	23.700
Tirosina	0.216	Rojo Fenol	0.022
Valina	0.452	Pluronic F68	1 [g/L]
Vitaminas		Putrescina	0.0625
Biotina	0.000	Piruvato de Sodio	1.000
Cloruro de Colina	0.064	Selenito de Sodio	28.900
Pantotenato de Calcio	0.005	Timidina	0.001
Ácido Fólico	0.006		
i-Inositol	0.070		
Niacinamida	0.017		
Hidrocloruro de Piridoxina	0.010		
Riboflavina	0.001		
Hidrocloruro de Tiamina	0.006		
Vitamina B12	0.001		

Anexo 3: Mediciones de Aminoácidos, Tasas y Flujos Metabólicos (Cultivo Preliminar)

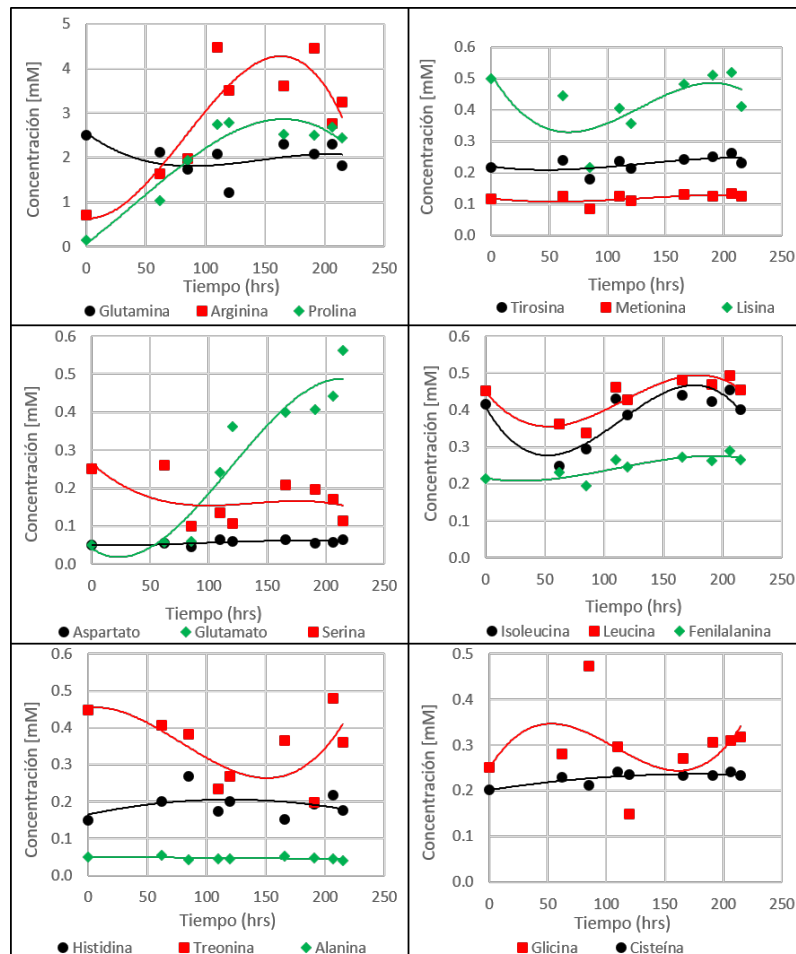


Figura 5.1: Concentración de aminoácidos durante pseudoperfusión inicial.

Tabla 5.2: Tasas de consumo o producción en pseudoperfusión inicial.

Especie	Tasa específica [mmol/10⁹ cell/hr]
Glucosa	$-6,07 \cdot 10^{-2}$
Alanina	$-1,09 \cdot 10^{-4}$
Cisteína	$-3,36 \cdot 10^{-4}$
Serina	$-5,74 \cdot 10^{-4}$
Glicina	$-5,06 \cdot 10^{-4}$
Lisina	$-1,03 \cdot 10^{-3}$
Leucina	$-8,45 \cdot 10^{-4}$
Glutamina	$-5,83 \cdot 10^{-3}$
Histidina	$5,80 \cdot 10^{-6}$
Prolina	$3,67 \cdot 10^{-3}$
Arginina	$2,41 \cdot 10^{-3}$
Glutamato	$3,29 \cdot 10^{-4}$
Asparragina	$-6,08 \cdot 10^{-5}$
Aspartato	$-1,18 \cdot 10^{-4}$
Isoleucina	$-8,44 \cdot 10^{-4}$
Metionina	$-2,51 \cdot 10^{-4}$
Treonina	$-8,93 \cdot 10^{-4}$
Valina	$-4,51 \cdot 10^{-5}$
Tirosina	$-4,41 \cdot 10^{-4}$
Fenilalanina	$-3,91 \cdot 10^{-4}$
Lactato	$8,00 \cdot 10^{-2}$
CO ₂	$1,20 \cdot 10^{-1}$
NH ₃	$9,10 \cdot 10^{-5}$
Biomasa	$3,21 \cdot 10^{-2}$

Tabla 5.3: Flujos metabólicos calculados para pseudoperfusión inicial.

Reacción	Flujo [mmol/10 ⁹ cell/hr]
Glc → 2Pyr	3,66·10 ⁻¹
Pyr → Lac	2,22·10 ⁻¹
Pyr → AcCoA + CO₂	8,81·10 ⁻²
AcCoA + OAA → αKGT + CO₂	2,29·10 ⁻¹
αKGT → SucCoA + CO₂	1,58·10 ⁻¹
SucCoA → Fum	1,62·10 ⁻¹
Fum → Mal	1,57·10 ⁻¹
Mal → OAA	1,73·10 ⁻¹
Gln → Glu + NH₃	2,44·10 ⁻²
Glu → αKGT + NH₃	-5,50·10 ⁻²
Mal → Pyr + CO₂	-1,43·10 ⁻²
Pyr + Glu → αKGT + Ala	2,22·10 ⁻⁴
Ser → Pyr + NH₃	1,01·10 ⁻³
2Gly → Ser + NH₃ + CO₂	2,21·10 ⁻⁴
Cys → Pyr + NH₃	2,42·10 ⁻³
Asp + αKGT → Glu + OAA	1,53·10 ⁻²
Asn → Asp + NH₃	1,48·10 ⁻²
His → Glu + NH₃ + CO₂	3,02·10 ⁻³
Pro → Glu	-2,47·10 ⁻²
Arg + αKGT → 2Glu + NH₃ + CO₂	-2,68·10 ⁻²
Ile + αKGT → Glu + SucCoA + AcCoA	1,54·10 ⁻³
Met + Ser + αKGT → Glu + Cys + SucCoA	8,82·10 ⁻³
Thr → SucCoA + NH₃	4,85·10 ⁻³
Val + αKGT → Glu + SucCoA + CO₂	-1,03·10 ⁻³
Phe → Tyr	-3,98·10 ⁻³
Tyr + αKGT → Glu + Fum + 2AcCoA + CO₂	-3,22·10 ⁻³
Lys + 2αKGT → 2Glu + 2AcCoA + CO₂	4,95·10 ⁻³
Leu + αKGT → Glu + 3AcCoA	1,62·10 ⁻³
→ BM	3,21·10 ⁻²
AA → BM	2,26·10 ⁻²
Glc → BM	4,00·10 ⁻³
Gln → BM	6,04·10 ⁻³
AA → Glu	-4,85·10 ⁻²
AA → SucCoA	6,24·10 ⁻³
AA → AcCoA	4,12·10 ⁻³
AA → TCA	-3,26·10 ⁻²
→ CO₂	1,20·10 ⁻¹
ΔL/ΔG	1,21

Anexo 4: Mediciones de Aminoácidos, Tasas y Flujos Metabólicos (Cultivo Mejorado)

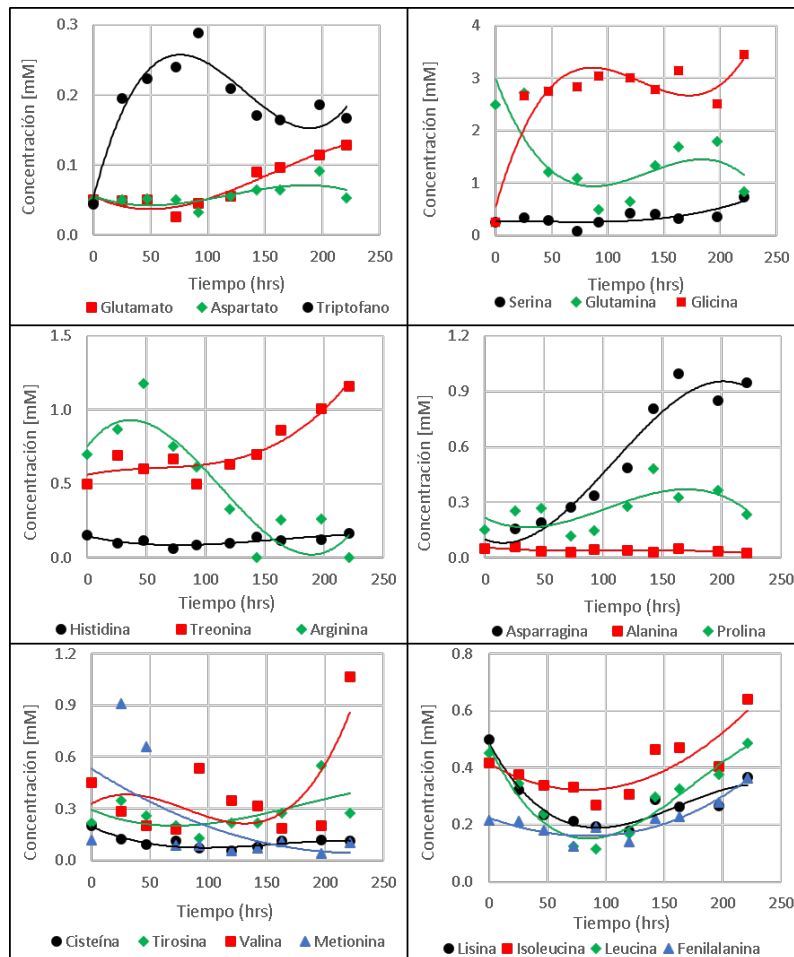


Figura 5.2: Concentración de aminoácidos durante pseudoperfusión mejorada.

Tabla 5.4: Tasas de consumo o producción en pseudoperfusión mejorada.

Especie	Tasa específica [mmol/10⁹ cell/hr]
Glucosa	$-3,87 \cdot 10^{-2}$
Alanina	$-1,61 \cdot 10^{-4}$
Cisteína	$-1,45 \cdot 10^{-4}$
Serina	$-1,78 \cdot 10^{-4}$
Glicina	$1,32 \cdot 10^{-3}$
Lisina	$-3,46 \cdot 10^{-4}$
Leucina	$-1,77 \cdot 10^{-4}$
Glutamina	$-2,51 \cdot 10^{-3}$
Histidina	$-2,45 \cdot 10^{-5}$
Prolina	$-1,39 \cdot 10^{-5}$
Arginina	$-6,90 \cdot 10^{-4}$
Glutamato	$-6,77 \cdot 10^{-5}$
Asparragina	$1,59 \cdot 10^{-5}$
Aspartato	$-1,25 \cdot 10^{-4}$
Isoleucina	$-1,11 \cdot 10^{-4}$
Metionina	$-2,61 \cdot 10^{-4}$
Treonina	$-1,13 \cdot 10^{-4}$
Valina	$3,10 \cdot 10^{-4}$
Tirosina	$-4,32 \cdot 10^{-5}$
Fenilalanina	$-3,45 \cdot 10^{-5}$
Lactato	$1,71 \cdot 10^{-2}$
CO ₂	$1,20 \cdot 10^{-1}$
NH ₃	$5,00 \cdot 10^{-6}$
Biomasa	$3,21 \cdot 10^{-2}$

Tabla 5.5: Flujos metabólicos calculados para pseudoperfusión mejorada.

Reacción	Flujo [mmol/10 ⁹ cell/hr]
Glc → 2Pyr	2,18·10 ⁻¹
Pyr → Lac	5,28·10 ⁻¹
Pyr → AcCoA + CO ₂	9,41·10 ⁻²
AcCoA + OAA → αKGT + CO ₂	2,00·10 ⁻¹
αKGT → SucCoA + CO ₂	1,64·10 ⁻¹
SucCoA → Fum	1,54·10 ⁻¹
Fum → Mal	1,43·10 ⁻¹
Mal → OAA	1,65·10 ⁻¹
Gln → Glu + NH ₃	3,41·10 ⁻³
Glu → αKGT + NH ₃	1,71·10 ⁻²
Mal → Pyr + CO ₂	-1,81·10 ⁻²
Pyr + Glu → αKGT + Ala	1,39·10 ⁻³
Ser → Pyr + NH ₃	-5,16·10 ⁻³
2Gly → Ser + NH ₃ + CO ₂	-2,99·10 ⁻³
Cys → Pyr + NH ₃	1,60·10 ⁻³
Asp + αKGT → Glu + OAA	-3,39·10 ⁻³
Asn → Asp + NH ₃	3,33·10 ⁻³
His → Glu + NH ₃ + CO ₂	1,70·10 ⁻³
Pro → Glu	-2,88·10 ⁻³
Arg + αKGT → 2Glu + NH ₃ + CO ₂	7,47·10 ⁻³
Ile + αKGT → Glu + SucCoA + AcCoA	-2,63·10 ⁻³
Met + Ser + αKGT → Glu + Cys + SucCoA	5,93·10 ⁻⁴
Thr → SucCoA + NH ₃	-1,65·10 ⁻³
Val + αKGT → Glu + SucCoA + CO ₂	-9,67·10 ⁻³
Phe → Tyr	-9,67·10 ⁻³
Tyr + αKGT → Glu + Fum + 2AcCoA + CO ₂	-8,24·10 ⁻³
Lys + 2αKGT → 2Glu + 2AcCoA + CO ₂	1,45·10 ⁻³
Leu + αKGT → Glu + 3AcCoA	-5,48·10 ⁻³
→ BM	6,69·10 ⁻²
AA → BM	4,72·10 ⁻²
Glc → BM	8,33·10 ⁻³
Gln → BM	1,26·10 ⁻³
AA → Glu	6,29·10 ⁻³
AA → SucCoA	-7,69·10 ⁻³
AA → AcCoA	-1,36·10 ⁻²
AA → TCA	-1,58·10 ⁻²
→ CO ₂	1,20·10 ⁻¹
ΔL/ΔG	0,48

Bibliografía

- [1] BAEKBO, P.; KRISTENSEN, C. S. & LARSEN, L. E. *Porcine circovirus diseases: a review of PMWS*. *Transboundary and emerging diseases*, 2012, vol. 59, p. 60-67.
- [2] LAWRENCE, PAULRAJ; DUMAS, FREDERIC. *Method for porcine circovirus production and PCV2 vaccines*. U.S. Patent No 9,944,904, 17 Abr. 2018.
- [3] FRESHNEY, R. IAN. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.
- [4] POHLHAMMER, KURT. *Análisis Comparativo de Sistemas de Cultivo en Suspensión de Células PK15 para la Producción de Vacunas Virales*. Guía: Ziomara P. Gerdtzen. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Santiago, 2019.
- [5] ABU-ABSI, SUSAN, ET AL. *Cell culture process operations for recombinant protein production*. En *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 35-68.
- [6] HU, WEI-SHOU ET AL. *An Advanced Course in Cellular Bioprocess Technology: Fundamentals and Frontiers*. University of Minnesota, Minneapolis, MN, 2007.
- [7] CHOTTEAU, VÉRONIQUE. *Perfusion Processes*. En Al-Rubeai M. (eds) *Animal Cell Culture*. Cell Engineering, vol 9. Springer, 2015.
- [8] HENRY, OLIVIER; KWOK, EZRA; PIRET, JAMES M. *Simpler noninstrumented batch and semi-continuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures*. *Biotechnology progress*, 2008, vol. 24, no 4, p. 921-931.
- [9] DORAN, PAULINE M. *Bioprocess engineering principles*. Elsevier, 1995.
- [10] WILKENS, CAMILA A.; ALTAMIRANO, CLAUDIA; GERDTZEN, ZIOMARA P. *Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, vol. 16, no 4, p. 714.
- [11] NAUWYNCK, H. J., ET AL. *Cell tropism and entry of porcine circovirus 2*. *Virus research*, 2012, vol. 164, no 1-2, p. 43-45.
- [12] TISCHER, ILSE, ET AL. *Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell*

- cycle dependence*. Archives of virology, 1987, vol. 96, no 1-2, p. 39-57.
- [13] YANG, XIN, ET AL. *Comparative analysis of different methods to enhance porcine circovirus 2 replication*. Journal of virological methods, 2013, vol. 187, no 2, p. 368-371
- [14] MISINZO, GERALD, ET AL. *Increased yield of porcine circovirus-2 by a combined treatment of PK-15 cells with interferon-gamma and inhibitors of endosomal-lysosomal system acidification*. Archives of virology, 2008, vol. 153, no 2, p. 337-342.
- [15] AL-FAGEEH, MOHAMED B., ET AL. *The cold-shock response in cultured mammalian cells: Harnessing the response for the improvement of recombinant protein production*. Biotechnology and bioengineering, 2006, vol. 93, no 5, p. 829-835.
- [16] BECERRA, SILVANA, ET AL. *Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity*. Biochemical Engineering Journal, 2012, vol. 60, p. 1-8.
- [17] SUNLEY, KEVIN; BUTLER, MICHAEL. *Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest*. Biotechnology advances, 2010, vol. 28, no 3, p. 385-394.
- [18] OZTURK, SADETTIN S. *Equipment for large-scale mammalian cell culture*. En *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 69-92.
- [19] HU, WEI-SHOU. *Engineering Principles in Biotechnology*. John Wiley & Sons, Incorporated, 2018.
- [20] NIENOW, A. W. *Reactor engineering in large scale animal cell culture*. Cytotechnology, 2006, 50(1-3), 9.
- [21] SONNLEITNER, BERNHARD. *Automated Measurement and Monitoring of Bioprocesses: Key Elements of the M³C Strategy*. En Mandenius, C. F., and Titchener-Hooker, N. J. (eds) *Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocesses* (pp. 1-33). Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.
- [22] MARC STANKE AND BERND HITZMANN *Automatic Control of Bioprocesses*. En Mandenius, C. F., and Titchener-Hooker, N. J. (eds) *Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocesses* (pp. 35-59). Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.