

DEL EDITOR

EL USO DE BIORREACTORES DESECHABLES EN LA INDUSTRIA BIOFARMACÉUTICA Y SUS IMPLICACIONES EN LA INGENIERÍA

THE USE OF DISPOSABLE BIOREACTORS IN THE BIOPHARMACEUTICAL INDUSTRY AND ITS IMPLICATIONS ON ENGINEERING

MAURICIO A. TRUJILLO-ROLDÁN

Unidad de Bioprocesos, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, maurotru@biomedicas.unam.mx

NORMA A. VALDEZ-CRUZ

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN: En la industria biofarmacéutica actual, los requerimientos para el diseño de un biorreactor difieren sustancialmente de aquellos de hace 50 años. Hoy en día las nuevas estrategias de cultivo permiten obtener alta densidad celular con altos rendimientos de productos biotecnológicos que deben cumplir con elevados estándares de calidad y normatividad compleja en su producción. Lo anterior obliga el desarrollo de nuevas tecnologías para suplir estas necesidades, por lo que en los últimos diez años el diseño y uso de biorreactores desechables ha crecido de manera exponencial. Los beneficios de la tecnología desechable son principalmente la eliminación de largos procesos de limpieza, esterilización, calificación, validación, reducción de tiempo entre lotes, el procesamiento de diferentes productos en la misma área, entre otros, lo que conlleva la disminución de los costos que implican esta serie de procedimientos.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología, Biorreactores, desechables, farmacéuticos.

ABSTRACT: In the current pharmaceutical industry the requirements for the design of a bioreactor are far different from those necessary 50 years ago. Nowadays, new strategies for growing cells produce high cell densities and high yields of biotechnology products with high standards regulations. That requires the development of new technologies to meet these needs, consequently in the past ten years, the design and use of disposable bioreactors has grown exponentially. The benefits of disposable technology, ranging from the elimination of lengthy and costly processes as cleaning, sterilization and validation, reduction in the time between production batches, production of various products in the same area, to diminish the costs because of this set of procedures.

KEYWORDS: Biotechnology, Bioreactors, disposables, pharmaceutical products.

DEMANDAS ACTUALES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFARMACÉUTICOS

El mercado de la industria biofarmacéutica era de alrededor de 45 mil millones de dólares en el 2004, y se prevé que pueda alcanzar más de 92 mil millones de dólares en el 2011 y con un cubrimiento de más del 10% de toda la industria farmacéutica [1-3]. Además, del crecimiento del mercado de los biofarmacéuticos, cada año se incorporan alrededor de 20 productos nuevos [3]. De ahí que la biotecnología especializada en

su manufactura se encuentre en la búsqueda constante de aumentar la productividad de los bioprocesos, acompañada de la disminución de los costos de producción, sin poner en riesgo la “calidad” del producto [4].

Los procesos productivos actuales para manufacturar proteínas recombinantes de alto valor agregado, requieren ser altamente productivos, robustos y con bajos costos de producción [5;6]. Mientras algunas proteínas recombinantes necesitan producirse en grandes cantidades como la insulina de la que se planea

una demanda de 16,000 kilogramos en 2012 [7], la mayoría de biofarmacéuticos son producidos en bajas cantidades (algunos kilogramos por año), por las cantidades necesarias para colmar la demanda mundial [1]. Es así, como la búsqueda de nuevas soluciones en la biología molecular y en el diseño de procesos tienen la finalidad de llegar a un mayor número de consumidores y encarar la creciente competencia de los biogénicos [8-10].

Durante la producción de biofármacos, los costos más significativos son los asociados a los tiempos de uso de los equipos, calificación y validación, que generalmente se encuentran por encima de los de la materia prima [11]. Muchas compañías han intentado reducir los costos asociados al uso de los equipos, acortando los tiempos de proceso, diseñando procesos más productivos y llevando a cabo campañas de producción más largas [11-13]. Este acercamiento ha llevado a las compañías a usar módulos de proceso desechables, con características ventajosas, pues previamente han sido esterilizados, validados y calificados pudiendo aventajar los pasos regulatorios. Además la instalación de estos módulos es sencilla, su operación es amigable y permiten que la misma área de producción pueda ser usada como espacio multipropósito [11;13]. La funcionalidad de los bioprocesos desechables depende de equipos como biorreactores, conectores, equipos de filtración, cromatografía, tubería y sistemas de almacenaje [4;11]. Al inicio de éste siglo el cambio en los diseños tradicionales estáticos en acero inoxidable a plantas modulares y móviles en “plástico” están en franco crecimiento, por lo que en esta revisión, compararemos los biorreactores desechables con aquellos convencionales y discutiremos sobre sus ventajas, desventajas y su mercado.

BIORREACTORES DE TANQUE AGITADO

Por definición un biorreactor es un sistema en el que una conversión biológica se lleva a cabo. Esta definición puede aplicarse a cualquier conversión realizada por enzimas,

microorganismos, células animales o vegetales [4;14-16]. Por otra parte, el término “biorreactor” se usa como sinónimo de “fermentador”, sin embargo, bajo una definición estricta un fermentador es un sistema que lleva a cabo un proceso anaeróbico para producir alcohol [14;15]. Por otra parte, los biorreactores de tanque agitado (*stirred tank biorreactor*, STB) son en general, los biorreactores más utilizados en la industria farmacéutica [17]. El Dr. Vijay Singh fundador de *Wave Biotech*, ahora parte de *GE-Healthcare* (www.gehealthcare.com) publicó “La ciencia en Ingeniería esta envenenada por cambios puntuales” [18]. Si bien es cierto, la tecnología de los biorreactores agitados de acero inoxidable han sido los dominantes en los últimos 50 años, adquirir un biorreactor agitado en 2009, no es muy diferente de aquellos diseños de sus predecesores reactores químicos y aquellos usados a finales de los 1950s para fabricar penicilina [18]. Como se presenta en la figura 1, la comparación de las relaciones de medidas básicas de diseño de un tanque agitado en 1954 [19], es similar a un diseño presentado en un libro actual de ingeniería bioquímica [14;20]. Los cambios asociados en los diseños de los biorreactores de acero inoxidable se han basado en su interior, es decir, en el diseño de nuevos impulsores, dispersores de aire, deflectores y en la adquisición y control de las variables del proceso. Sin embargo, todos se rigen sobre el mismo diseño tradicional que se presenta en la figura 1. Además, los requerimientos y necesidades actuales para la producción de biomoléculas terapéuticas a gran escala y a menor costo, están forzando la innovación de biorreactores, haciéndolo un campo nuevo en el diseño ingeniería y en el entendimiento de los fenómenos de transferencia que aquí ocurren, como a su vez en la optimización de estos fenómenos [4;13;21;22].

En la mayoría de la industria biotecnológica actual, la producción de proteínas recombinantes expresadas en hospederos como bacterias, levaduras, células animales o vegetales en cantidades comerciales, emplean por lo general equipos reutilizables de acero inoxidable o vidrio de alto costo, que requieren limpieza, esterilización, validación y calificación en cada

lote de producción [23]. El enfoque de tener todo el “hardware” de producción disponible, es un proceso costoso que genera alta demanda en los estándares de operación e inevitablemente aumenta los costos de mantenimiento de equipo y entrenamiento de personal [4;10]. Para aminorar los costos planteados, un gran número de compañías se han especializado en la

construcción de biorreactores y equipos desechables validados y calificados. Los equipos desechables han favorecido la confiabilidad en el éxito de los lotes de cada proceso evitando la limpieza y esterilización *in situ* de los reactores y de las áreas, haciendo sencilla la validación para cumplir con los requerimientos regulatorios de la industria biofarmacéutica [4;21;24].

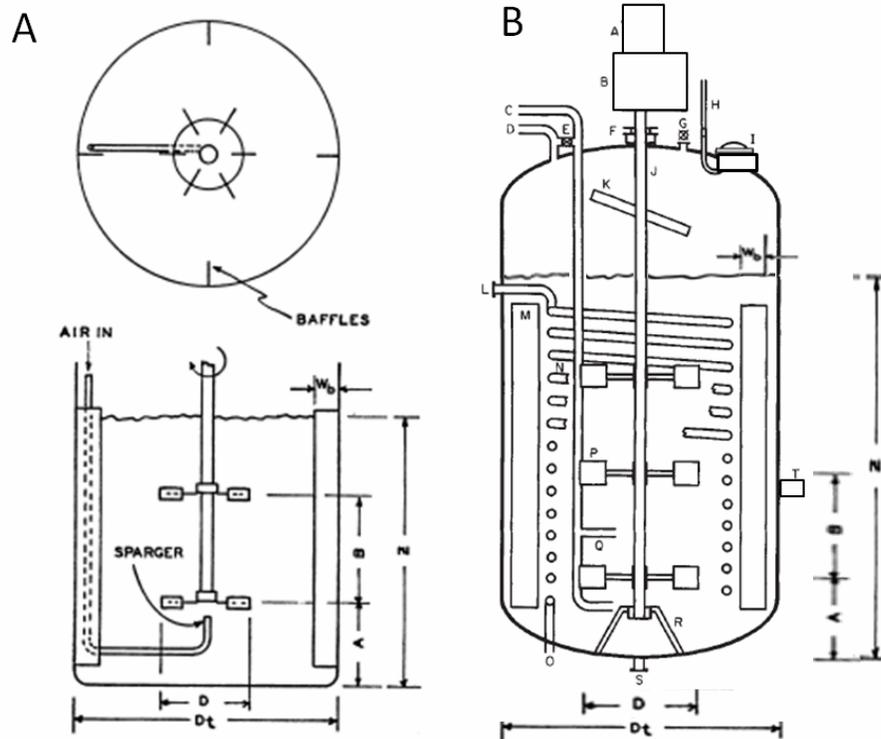


Figura 1. Diseños de biorreactores de tanque agitado. (A). Diseño de 1954, tomado de Finn [19], donde las dimensiones típicas son $Z/Dt = 1.0$; $D/Dt = 0.34$; $A/D = 0.8$ a 1.0 ; $B/D = 1.0$ a 1.2 ; $Wb/D = 0.08$ a 0.12 . (B) Diseño actual de un biorreactor convencional de tanque agitado, donde A y B son el motor y base reductora de velocidad, C y D son la entrada y salida de aire, E es una válvula *by-pass* de aire, F el sello de la flecha de agitación, G, H e I son sistemas de limpieza y mirillas de vidrio, J es el eje del agitador, K es un cortador de espuma, O y L son entrada y salida del agua de enfriamiento del serpentín, M son los deflectores, N serpentín de enfriamiento, P es el impulsor, Q es el aireador, S descarga del medio de cultivo y T es la válvula de muestreo. El diseño en términos de dimensiones permanece similar a los diseños previos relación de diámetros de tanque a impulsor (D/Dt) de 0.3; altura del primer impulsor a base del tanque (A/D) es igual a un diámetro de impulsor; la distancia entre impulsores es igual al diámetro de un impulsor (B/D) y los baffles (Wb/D) de $1/10$ a $1/12$ del diámetro del tanque

Figure 1. Design of stirred tank bioreactors. (A). Design from 1954 taken by Finn [19], where the typical dimensions are $Z/Dt = 1.0$, $D/Dt = 0.34$, $A/D = 0.8$ to 1.0 , $B/D = 1.0$ to 1.2 ; $Wb/D = 0.08$ to 0.12 . (B) Design of a current conventional stirred tank bioreactor, where A and B are speed-reduction unit and agitator motor, C and D are the air inlet and outlet, E is by-pass valve, F shaft seal, G, H and I are manholes with sight glass, J agitator shaft, K foam breaker, O and L water cooling coil inlet and outlet, M baffles, N cooling coil, N, P impeller, Q aerator, S discharge of culture medium and T is the sampling valve. The design in terms of size remains similar to previous designs, *i.e.* ratio tank to impeller diameter (D/Dt) of 0.3, height of the first impeller to the tank base (A/D) is equal to impeller diameter, the distance among drivers is equal to the diameter of an impeller (B/D) and baffles (Wb/D) $1/10$ to $1/12$ the diameter of the tank

Hyclone (www.hyclone.com), ahora parte de *ThermoFisher* es uno de los líderes en los sistemas de un solo uso (S.U.B. *single-use bioreactors*) y existen en el mercado formatos de 50, 250 y 1,000 L. En este formato el biorreactor está compuesto de una bolsa de plástico desechable, sistema de aireación, agitación, filtros de aire y puertos de adición y remoción de componentes adheridos a la bolsa, también desechables. En la figura 2 se presenta el diseño de uno de estos, tomado con permiso de la página electrónica de *Hyclone*. Como se puede observar en la figura 2, la “bolsa” está colocada en el interior de un soporte de acero que sirve como sistema para la transferencia de calor. La potencia del motor para agitación se entrega por medio de un eje metálico que se coloca en el interior de un agitador plástico (pre-adherido a la bolsa). La instrumentación y control de estos biorreactores se puede llevar a cabo con el *hardware* y *software* de biorreactores tradicionales de acero inoxidable.

La compañía *Xcellerx* (www.xcellerex.com) es otra compañía líder en la construcción de biorreactores desechables, con volúmenes que van de 50 a 2,000 L. *Xcellerx* ofrece la plataforma completa, incluyendo *hardware* y *software* de instrumentación y control. Para el arranque productivo, *Xcellerx* promete al menos una reducción del 70% en tiempo de la puesta en marcha del sistema completo de cultivo, al compararse con aquellos biorreactores de acero inoxidable que puede llegar a ser de hasta 5 años. Otra compañía que recientemente entró al mercado de biorreactores agitados desechables es *Sartorius-stedim* (www.sartorius-stedim.com), con su nuevo BIOSTAT® CultiBag STR de 200 L. Estos equipos tienen la ventaja de contar con su propio sistema de electrodos de pH y oxígeno disuelto desechables y el sistema completo de *hardware* y *software* de instrumentación y control, que *Sartorius* utiliza para sus biorreactores de tanque agitado convencionales.

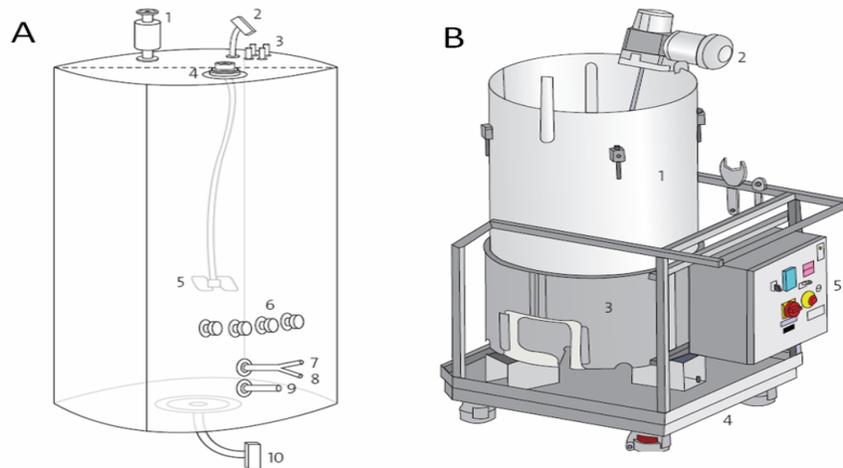


Figura 2. (A) Diseño del biorreactor desechable *Thermo Scientific HyClone Single-Use Bioreactor* (S.U.B.) y (B) su contenedor (Tomado con permiso de www.hyclone.com). (A), con: 1. Filtro de venteo, 2. Puerto de sobrepresión de gases de salida, 3. Puertos para adición de medio de cultivo y otros componentes, 4. Sello de cojinete para el agitador, 5. Impulsor de polietileno moldeado ensamblado por una tubería que da la forma al agitador, 6. Puertos para la integración de electrodos de pH y oxígeno disuelto estándar de 1/2 pulgada, 7. Puerto para el sensor de temperatura, 8. Puerto de muestreo, 9. Puerto para drenado y 10. Sistema de aireación. (B) con: 1. Contenedor de acero inoxidable 304, 2. Motor, 3. Chaqueta de calentamiento, 4. Plataforma y 5. Unidad de control de temperatura y Mezclado únicamente. Los parámetros de cultivo son controlados por sistemas adicionales convencionales

Figure 2. (A) Design of *Thermo Scientific HyClone Single-Use Bioreactor* (SUB) and (B) its container (Taken with permission from www.hyclone.com). (A), with the following parts: 1. Vent filter, 2. Gas overlay port, 3. Ports for the addition of culture medium and other components, 4. Seal/bearing for the stirrer, 5. Molded polyethylene shaft and impeller, 6. Ports for integration pH and dissolved oxygen standard electrodes, 7. Temperature port, 8. Sampling port, 9. Drain port and 10. Gas sparge. (B) with: 1. 304 stainless steel container, 2. Mixer motor, 3. Electrical heater, 4. Platform and 5. Control unit. The parameters of culture are controlled by additional conventional control units

Cuando se habla de la selección de un biorreactor, se debe reconocer que cada cultivo presenta demandas diferentes y que por ejemplo cultivos de alta densidad de bacterias, o levaduras son llevados a cabo en menos de un día, con altas demandas de transferencia de oxígeno y calor [25-27]. Un cultivo de células animales o vegetales puede prolongarse por más de una semana, con demandas de oxígeno y calor menores que aquellos cultivos bacterianos o de levaduras [5;28;29]. Desde esta perspectiva, los biorreactores desechables han sido diseñados en su mayoría para cultivos con baja demanda de oxígeno y calor, pues las velocidades de agitación y capacidades de transferencia de oxígeno y calor son en general menores que las que pueden alcanzarse en biorreactores convencionales de acero inoxidable. Hay pocas referencias donde se presentan los sistemas desechables para la producción de proteínas recombinantes usando bacterias o levaduras y en estos sistemas la tecnología en acero inoxidable sigue siendo utilizada ampliamente [22;30-32].

Por otra parte, el desarrollo de nuevos biorreactores se ha encaminado a mejorar los fenómenos de transferencia de momento, calor y masa, tratando de evitar los efectos de estrés hidrodinámicos asociados a los agitadores convencionales y sistemas de aireación [18;21;32]. Se ha demostrado que la gran mayoría de diseños actuales de agitación y aireación en los biorreactores agitados, afectan dramáticamente la viabilidad y productividad de los cultivos de células animales o vegetales [32;33]. Es por esta razón que nuevos diseños de biorreactores que no tengan tales efectos sobre las células se han presentado en la literatura y en el mercado, aunque en algunos casos sin fundamentos claros de diseño ingenieril [21;34].

DISEÑOS NO CONVENCIONALES

En años recientes, la demanda de infraestructura para producir proteínas recombinantes terapéuticas, ha inferido en el desarrollo de biorreactores desechables, lo cuales han llamado especial atención por su simplicidad y facilidad de uso [21]. El primero y más conocido es el denominado “biorreactor de olas” (*Wave Bioreactor*®) introducido por el Dr. Vijay

Singh fundador de *Wave Biotech* a finales de los 90s, hoy parte de *GE healthcare* (www5.gelifesciences.com). El biorreactor consiste en una bolsa desechable, pre-esterilizada, flexible en forma de “almohada” y colocada en una superficie que se mueve de un lado a otro (figura 3). El control de temperatura se lleva a cabo en la superficie metálica sobre la que descansa la bolsa, y el oxígeno disuelto y el pH son medidos en línea por electrodos desechables y controlados por un sistema de adquisición y control adicional. La bolsa se llena con medio de cultivo hasta la mitad de su capacidad y es inflado con aire (oxígeno o mezclas de gases) usando un filtro también desechable de 0.22 μm . Como cualquier sistema desechable, se eliminan los costos de las operaciones asociadas a las buenas prácticas de fabricación. Actualmente, los biorreactores de bolsa abarcan una capacidad desde 500 mL hasta 500 L [22;35-37].

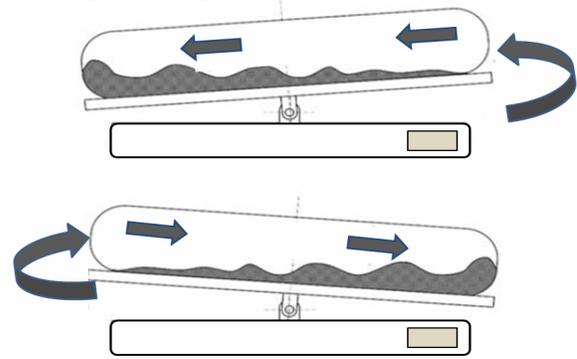


Figura 3. Diagrama de los perfiles de flujo de un *Wave Bioreactor*. La agitación se controla como la frecuencia de movimientos por minuto y el ángulo sobre la perpendicular. El control de temperatura se lleva a cabo sobre la superficie de la plancha metálica sobre la que está colocada la bolsa. Cada Bolsa contiene puertos de adición de de medio de cultivo y otros componentes, filtro de venteo y de entrada de aire, puertos para la integración de electrodos de pH y oxígeno desechables

Figure 3. Schematic profiles of the flow of a *Wave Bioreactor*. Agitation is controlled by the frequency of movements per minute and its angle. Temperature control is carried out on the surface of the metal plate containing the bag. In the bag are ports for addition of culture medium or other components, vent filter and air inlet and outlets, also pH and dissolved oxygen electrodes are disposable

Un gran número de compañías presentan diseños similares al *Wave Bioreactor*®; *Applikon* (www.applikonbio.com), presentan el *Appiflex*®, otro jugador es *Sartorius-stedim* (www.sartorius-stedim.com), donde con su marca *BIOSTAT*® *CultiBag* RM, que ha sido ampliamente comercializado por tener un sistema robusto de adquisición y control de los parámetros de cultivo como lo es el *BioPAT*® y que es de gran aceptación entre operarios e ingenieros de proceso [35].

Un parámetro importante para tener en cuenta en cultivos agitados es el estrés hidrodinámico generado por el flujo de fluidos y el mezclado [32]. Este parámetro juega un papel de gran importancia en el crecimiento y producción de cada línea celular, como se ha demostrado ampliamente en tanques agitados mecánicamente [32;33;38-42]. Sin embargo, son pocos los reportes relacionados con el efecto del estrés hidrodinámico en cultivos celulares en reactores de olas [21;22;36;43].

Un diseño novedoso es presentado por *Amproteín* (www.amprotein.com), quienes presentan bolsas de una forma cónica que son agitadas siguiendo un patrón orbital de rotación similar al que es utilizado para cultivos de células en matraces agitados [44]. *Amproteín* presenta tres propuestas de 5, 50 y 150 L de sus biorreactores. Sin embargo, la diferencia o similitud que presenta el diseño de estos biorreactores con matraces agitados instrumentados de gran tamaño, no ha sido discutida.

Como se había discutido previamente, por las limitaciones intrínsecas en los fenómenos de transferencia de masa y calor, los ejemplos antes mencionados se comercializan principalmente para el cultivo de células de mamífero o de insecto. Por su parte, la compañía *Cellexus Biosystems* (www.cellexusbiosystems.com) recientemente comercializó bolsas desechables (*CellMaker PLUS*™ y la *HybridBag*™) en las que se propone se puede cultivar cualquier línea celular (bacterias, levaduras, células de mamífero e insecto), con un completo control todos los parámetros de cultivo. Estos biorreactores permiten transferencias de oxígeno similares a las alcanzadas en reactores de acero

inoxidable. Sin embargo, la escala de estos reactores es para cultivos de entre 1.0 L hasta 50 L.

Al ser sistemas desechables, el descartarlos se convierte en un nuevo elemento en el proceso que no se había tenido en cuenta. Algunas bolsas son re-esterilizables, pero implica, procesos *in situ* y las validaciones y calificaciones que hacían de este sistema atractivo. En su mayoría estos sistemas son incinerados por compañías especializadas. Recientemente, fue publicado que *AmProtein* está trabajando en el desarrollo de biorreactores desechables fabricados con plásticos biodegradables, siendo la primera industria biotecnológica que planea el desarrollo de módulos completos amigables con el medio ambiente.

OTROS SISTEMAS DESECHABLES EN BIOPROCESOS

Si bien es cierto, los biorreactores desechables son los equipos más representativos en un bioproceso, sin embargo no podemos dejar de mencionar que muchos otros equipos y sistemas desechables se están usando ampliamente en las compañías biofarmacéuticas, aminorando los costos productivos. Existen ya en el mercado diseños de sistemas de mezclado desechable, que a su vez son usados como contenedores y cada una de las compañías mencionadas previamente, comercializan estos equipos. Por ejemplo, *Atmi-lifescience* (www.atmi-lifesciences.com) tienen un amplio espectro de sistemas novedosos de mezclado y almacenaje de bio-intermediarios en los procesos, con nuevos diseños, con volúmenes que pueden ser de hasta 2,000 L. *Xcellerex* ofrece tanques cúbicos desechables para volúmenes menores a 1,000 L. *Thermo-Hyclone* ofrece también volúmenes menores de 1,000 L, con la facilidad de un contenedor de “polvos” desechable que puede conectarse de manera fácil y estéril al sistema de mezclado.

Por otra parte, cuando se piensa en cromatografía, la complejidad y los altos costos son dos elementos a tomarse en cuenta, principalmente por la limpieza y regeneración de las matrices y los pasos de validación. *Sartorius AG* (www.sartorius.com) es el líder indiscutible

de este mercado donde *Pall Co.* (www.pall.com) es su gran competidor. Ambas compañías ofrecen cromatografía desechable en cápsulas o membranas. Un nuevo competidor en el mercado es *Upfront Chromatography* (www.upfront-dk.com), quienes ofrecen desarrollar sistemas de purificación desechables dirigidos y personalizados para cada necesidad y compañía productora de biofarmacéuticos que lo requiera, en especial en la producción de anticuerpos monoclonales [45].

PERSPECTIVAS

A través de los años se ha demostrado que los biorreactores de acero inoxidable presentan excelentes características en términos de sus transferencias, teniendo por límite la capacidad volumétrica. En la industria biofarmacéutica, parece ser que un par de miles de litros serán los volúmenes más grandes en gran escala. Empresas como *Xcellerex* y *Hyclone* ya han llegando a lo que parecen ser los mayores volúmenes, con diseños de biorreactores desechables de 2,000 L. Aunque la escala ha sido superada aún tienen algunos limitantes geométricos y problemas de las transferencias a gran escala.

La biotecnología moderna requiere las bondades de los biorreactores de acero inoxidable pero con los beneficios de lo desechable. Al revisar con detalle los diseños de los biorreactores desechables, las mejoras tecnológicas necesarias son aquellas involucradas en la transferencia de masa y calor. Estos adelantos son esenciales para satisfacer las demandas de los procesos de alto título a gran escala. Es muy seguro que estos biorreactores desechables se convertirán en la tecnología dominante en la industria biofarmacéutica. Su adopción está impulsada por dos tendencias; la reducción de los costos de fabricación y el desarrollo de procesos de alto título de producción.

Para vencer la frontera tecnológica establecida hasta ahora, se requerirá de importantes avances tecnológicos que complementen las necesidades expuestas, así como los requerimientos particulares de diferentes procesos productivos,

para que en un futuro cercano más individuos tengan la posibilidad de adquirir biofármacos seguros y de excelente calidad a bajo costo.

REFERENCIAS

- [1] PAVLOU AK, REICHERT JM. Recombinant protein therapeutics success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotech.* 2004. (12):1513-1519.
- [2] Datamonitor. Recombinant Therapeutic Proteins: Delivering a \$53 Billion Mature Market by 2010. 2004. May 3.
- [3] PARMAR HC. Biopharmaceuticals market overview. *Pharma Technol Europe.* 2006. March.
- [4] SINCLAIR A. Disposable Bioreactors: The Next Generation. *BioPharm International.* 2008.
- [5] LEE SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1996. (3): 98-105.
- [6] SODOYER R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs.* 2004. 18(1):51-62.
- [7] MARCIAL G.G. From SemBiosys, A new kind of insulin. *Business Week.* 13-8-2007.
- [8] POLASTRO E, LITTLE A. Biogenerics: Myth or reality? *Innovations Pharma Technol.* 2001. 63-65.
- [9] GRABOWSKI H, COCKBURN I, LONG G. The market for follow-on biologics: how will it evolve? *Health Aff.* 2006. 25(5):1291-301.
- [10] MANHEIM BS, JR., GRANAHAN P, DOW KJ. 'Follow-on biologics': ensuring continued innovation in the biotechnology industry. *Health Aff.* 2006; 25(2):394-404.

- [11] PENDLEBURY D. The use of disposable systems in the manufacture of biopharmaceuticals. *Bioprocessing J.* 2006 5(3):54-58.
- [12] JAIN E, KUMAR A. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnol Adv.* 2008. (1):46-72.
- [13] HEATH C, KISS R. Cell culture process development: advances in process engineering. *Biotechnol Prog.* 2007. (1):46-51.
- [14] NAJAFPOUR GD. Bioreactor Design. *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier. 2007. p. 142-69.
- [15] NAJAFPOUR GD. Application of Fermentation Processes. *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier. 2007: p. 252-62.
- [16] NAJAFPOUR GD. Bioprocess Scale-up. *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier. 2007: p. 287-331.
- [17] WILLIAMS JA. Keys to a bioreactor selection. *Chem Eng Prog.* 2002. 34-41.
- [18] SINGH V. Tech Focus: Prognosticating the future of the bioreactor, specific demands will impact the ongoing evolution of this device. *GEN News* 2008. 28[2].
- [19] FINN RK. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. *Bacteriol Rev* 1954 (4):254-74.
- [20] QUINTERO R. *Ingeniería Bioquímica.* México, D.F.: Alhambra Mexicana, 1981.
- [21] SINGH V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnol.* 1999 (1-3):149-158.
- [22] MIKOLA M, SETO J, AMANULLAH A. Evaluation of a novel Wave Bioreactor(R) cellbag for aerobic yeast cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2007. 30(4): 231-241
- [23] BROWN F, LUBINIECKI AS (editors). Developments in biologicals, process validation for manufacturing of biologics and biotechnology products. *International Association for Biologicals.* 2001. [113]. Berlin.
- [24] MARX U, DEMMLER C, LUBITZ A, GIESE C. Design, prototyping and operation of disposable bioreactor systems for stem cell cultivation and tissue formation. *J Biotechnol.* 2008. 136 (S1):S115-S116.
- [25] NAJAFPOUR GD. Dissolved oxygen measurement and mixing. *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier, 2007: p. 14-21.
- [26] NAJAFPOUR GD. Gas and liquid system (aeration and agitation). *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier, 2007: p. 22-68.
- [27] NAJAFPOUR GD. Fermentation process control. *Biochemical Engineering and Biotechnology.* Amsterdam, Elsevier, 2007: p. 69-80.
- [28] GRAUMANN K, PREMSTALLER A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J.* 2006. (2):164-86.
- [29] WARNOCK JN, AL-RUBEAI M. Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006. 45(Pt 1):1-12.
- [30] MILLARD CS, STOLS L, QUARTEY P, KIM Y, DEMENTIEVA I, DONNELLY MI. A less laborious approach to the high-throughput production of recombinant proteins in *Escherichia coli* using 2-liter plastic bottles. *Protein Expr Purif.* 2003. 29(2):311-320.
- [31] BRODSKY O, Cronin CN. Economical parallel protein expression screening and scale-up in *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics.* 2006. 7(2):101-108.

- [32] TRUJILLO-ROLDÁN MA, VALDEZ-CRUZ NA. Hydrodynamic stress: Death and cellular damage in agitated cultures. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006. 48(3-4):269-80.
- [33] ZABALA MA, AGUIRRE A, ANGARITA M, MONTOYA C, RESTREPO. J. Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna.* 2009. 157, 113-121.
- [34] SINGH V. The Wave Bioreactor Story. *GE Healthcare.* www.gehealthcare.com. 2007. July 24
- [35] EIBL R, WERNER S, EIBL D. Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009. In press. DOI: 10.1007/10_2008_15.
- [36] EIBL R, EIBL D. Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. In: Gupta SD, Ibaraki Y., editors. *Plan Tissue Culture Engineering.* Springer, 2006: p. 203-27.
- [37] HALDANKAR R, LI D, SAREMI Z, BAIKALOV C, Deshpande R. Serum-free suspension large-scale transient transfection of CHO cells in WAVE bioreactors. *Mol Biotechnol.* 2006. 34(2):191-9.
- [38] HUTMACHER DW, SINGH H. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture. *Trends Biotechnol.* 2008. 26(4):166-172.
- [39] HUA J, ERICKSON LE, YIIN TY, GLASGOW LA. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Crit Rev Biotechnol.* 1993. 13(4):305-328.
- [40] TORRES-MARTÍNEZ D., MELGAREJO-TORRES R., GUTIÉRREZ-ROJAS M., AGUILERA-VÁZQUEZ L., MICHELETTI M., LYE G.J., HUERTA-OCHOA S. Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (air-water-ionic liquid) stirred tank bioreactor. *Biochem Eng J.* 2009. doi: 10.1016/j.bej.2009.03.014.
- [41] GARCIA-OCHOA F, GOMEZ E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv.* 2009. 27(2):153-176.
- [42] ZHU H, NIENOW AW, BUJALSKI W, SIMMONS MJH. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping “Elephant Ear” agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements. *Chem Eng Res Des.* 2009. 87(3):307-317.
- [43] WEBER W, WEBER E, GEISSE S, MEMMERT K. Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. *Cytotechnol.* 2002. 38(1-3):77-85.
- [44] JIA Q, LI H, HUI M, HUI N., JOUDI A., RISHTON G., BAO L., SHI M., ZHANG X., LUANFENG L., XU J., LENG G. A bioreactor system based on a novel oxygen transfer method. *BioPro Int,* 2008. 1-5.
- [45] Market profile: Disposable chromatography. *Instrument Business Outlook.* 2008. 15-7-2008.