

JULIO DE 2022



***Proceso de purificación de proteínas
recombinantes: Optimización en la etapa de
centrifugación del Antígeno del virus de la
Hepatitis B***

Tesis presentada para optar al título de Maestría en Procesos Biotecnológicos
Farmacéutico Raúl Rivas
Director de Tesis: Dra. Carla Quevedo
Codirector de Tesis: Dra. Carolina Martínez
Lugar de trabajo: Sanofi

Agradecimientos

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Carla Quevedo, por su guía y apoyo ofrecido desde el comienzo de esta tesis.

A mi gerente y codirectora de tesis, Dra. Carolina Martínez, quien me brindó la oportunidad de desarrollar este trabajo en el área de Tecnología de Procesos (MTECH) del laboratorio Sanofi.

A mis compañeros de MTECH ya que sin su ayuda y conocimiento este trabajo no hubiese sido posible.

Al Mg. Franco Liporace por compartir su experiencia y guía.

A mis compañeros y profesores de Maestría, por hacer fácil la cursada y en particular a Vanina Di Gregorio, la primera Magister de nuestra cohorte por sus consejos y sugerencias.

Finalmente, un especial agradecimiento a mi familia por el apoyo, comprensión y acompañamiento en este camino.

ÍNDICE

Índice de Contenido

1.	Resumen.....	10
2.	Introducción	13
2.1.	Biotecnología y producción de medicamentos.....	13
2.2.	Vacunas	15
2.2.1.	Tipos de vacunas	15
2.3.	Vacuna contra Hepatitis B.....	18
2.3.1.	Hepatitis B.....	18
2.3.2.	Vacuna y Hepatitis B en Argentina.....	19
2.4.	Proceso de elaboración de HBsAg	22
2.4.1.	Proceso de producción de HBsAg derivado de <i>Hansenula polymorpha</i>	22
2.4.2.	Fermentación y lavado celular	23
2.4.3.	Purificación (downstream processing).....	24
2.5.	Purificación de proteínas	25
2.5.1.	Proceso de separación sólido – líquido	26
2.5.2.	Fundamentos del método de centrifugación.....	26
2.5.3.	Centrífugas continuas.....	28
2.5.4.	Tipos de centrífugas	28
2.5.5.	Centrífuga tubular	29
2.5.6.	Determinación del flujo óptimo de alimentación en una centrífuga continua.....	29
2.6.	Producción de la vacuna de Hepatitis B en Argentina (Sanofi)	30
3.	Objetivos generales	33
4.	Materiales y métodos	35
4.1.	Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B	35
4.2.	Precipitación con PEG (paso 5)	37
4.3.	Controles de Proceso.....	38
4.3.1.	Densidad óptica del sobrenadante de PEG.....	39
4.3.2.	Pureza por SDS PAGE.....	40
	Proceso base y escalado:	41

4.4.	Obtención de valores de OD600nm y %Pureza en IEC	41
4.4.1.	Proceso base: Determinación de OD600nm y %Pureza en IEC	41
4.4.2.	Proceso de escalado: Determinación de OD600nm y %Pureza en IEC	42
4.5.	Optimización de la etapa de Precipitación con PEG	43
4.5.1.	Mejora en la eliminación de sólidos remanentes (Scrape): experimento 1	43
4.5.2.	Modificación de flujo de alimentación: experimento 2.....	45
4.5.3.	Modificación de la carga en el recipiente de centrifugación: experimento 3	47
4.5.3.1.	Evaluación de la carga en cada ciclo de centrifugación.....	47
4.5.3.2.	Disminución de la carga por aumento del número de ciclos.....	48
5.	Discusión y resultados.....	51
5.1.	Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B – Proceso base	51
5.2.	Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B – Proceso escalado.....	55
5.3.	Comparación Proceso Base vs Proceso Escalado	58
5.4.	Ensayos para la optimización de la etapa de Precipitación con PEG.....	60
5.4.1.	Mejora en la eliminación de sólidos remanentes: experimento 1.....	61
5.4.2.	Experimento 2: Modificación de flujo de alimentación.....	66
5.4.3.	Experimento 3: Modificación de la carga en el recipiente de centrifugación	69
5.4.3.1.	Carga de producto por ciclo de centrífuga	69
5.4.3.2.	Centrifugación: 9 ciclos vs 12 ciclos.....	73
5.5.	Análisis integral de los experimentos.....	76
5.5.1.	OD600nm.....	76
5.5.2.	Pureza de IEC.....	79
6.	Conclusiones	83
7.	Bibliografía	85
8.	Anexos.....	89
8.1.	Anexo 1: Proceso base – valores de OD600nm y pureza de IEC	89
8.2.	Anexo 2: Proceso escalado – valores de OD600nm y pureza de IEC.....	93

Índice de Tablas

Tabla 1 Esquema del proceso de producción	36
Tabla 2 Parámetros de proceso de la etapa de Precipitación con PEG (base vs escalado)	38
Tabla 3 Parámetros de proceso, ensayo mejora eliminación de sólidos (scrape).....	45
Tabla 4 Parámetros de proceso, ensayo modificación flujo de alimentación.....	46
Tabla 5 Parámetros de proceso, ensayo modificación de la carga en el recipiente de centrifugación.....	47
Tabla 6 Parámetros de proceso – 9 vs 12 ciclos.....	49
Tabla 7 Proceso base – Densidad óptica de referencia	52
Tabla 8 Proceso base – Pureza de IEC (%) de referencia	53
Tabla 9 OD600nm vs %Pureza – Análisis de regresión lineal.....	54
Tabla 10 Proceso base – Valores de referencia.....	55
Tabla 11 Proceso escalado – Densidad óptica de referencia.....	56
Tabla 12 Proceso escalado – Pureza de IEC	57
Tabla 13 OD600nm vs %Pureza – Análisis de regresión lineal.....	58
Tabla 14 Parámetros de proceso – Base vs Escalado	58
Tabla 15 Controles de Proceso – Base vs Escalado	59
Tabla 16 OD600nm y %Pureza – Scrape Ajustado	63
Tabla 17 Comparación resultados Experimento 1, Escalado y Proceso Base.....	66
Tabla 18 OD600nm y %Pureza – Modificación de flujo de alimentación.....	67
Tabla 19 Comparación resultados Experimento 2, Escalado y Proceso Base.....	69
Tabla 20 Comparación resultados Experimento 1 y Experimento 2.....	69
Tabla 21 OD600nm off line – Modificación Carga Recipiente	70
Tabla 22 OD600nm – 12 Ciclos de Centrifugación	73
Tabla 23 Comparación de resultados, escalado y proceso base: experimento 3	76
Tabla 24 Comparación resultados Experimento 1 y Experimento 3.....	76
Tabla 25 OD600nm – Comparación entre todos los experimentos.....	77
Tabla 26 OD600nm – Comparación entre todos los experimentos.....	79

Índice de Figuras

Figura 1 Prevalencia de Hepatitis B, extraído de SchweitzerA. (2015).....	19
Figura 2 Hepatitis B en Argentina, extraído de Boletín N°2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020).....	19
Figura 3 Calendario de Vacunación, extraído de Boletín N° 2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020).....	20
Figura 4 Cobertura de Vacunación en Argentina, extraído de Boletín N° 2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020)	21
Figura 5 Fermentación de HBsAg, extraído de Gellinsen G. (2002).....	24
Figura 6 Esquema de trabajo con una centrífuga continua	28
Figura 7 Esquema de una centrífuga tubular - Grasselli M. (2015).....	29
Figura 8 Caudal óptimo, extraído de Steinebach F. (2016).....	30
Figura 9 Sanofi Pasteur Sitio Pilar. Planta de producción del HBsAg, extraído de página de Sanofi	31
Figura 10 Esquema de la etapa de Precipitación con PEG.....	37
Figura 11 Equipo de centrifugación CARR, extraído de psangelus.com.....	38
Figura 12 Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, extraído de jenck.com	39
Figura 13 Vista interior de recipiente de centrífuga y sistema de raspado, extraído de psangelus.com	44
Figura 14 Esquema ensayo modificación del flujo de alimentación.....	46
Figura 15 Esquema ensayo modificación de la carga en el recipiente de centrifugación	48
Figura 16 Producto procesado 9 vs 12 ciclos – Modificación Carga Recipiente.....	49
Figura 17 Histograma OD600nm – Proceso base	51
Figura 18 Histograma OD600nm – Proceso base segmentado por centrífuga.....	52
Figura 19 Histograma Pureza etapa de IEC (%) – Proceso base.....	53
Figura 20 Relación entre OD600nm en etapa Precipitación con PEG y el porcentaje de Pureza en etapa de IEC	54
Figura 21 Histograma OD600nm – Proceso escalado.....	56
Figura 22 Histograma Pureza etapa de IEC (%) – Proceso base.....	57
Figura 23 Relación entre OD600nm en etapa Precipitación con PEG y el porcentaje de Pureza en etapa de IEC	57
Figura 24 Datos individuales de OD600nm segmentados por escala	59
Figura 25 Datos individuales de Pureza segmentados por escala	60
Figura 26 Interior del recipiente luego de finalizado el proceso de centrifugación (antes del raspado).....	61
Figura 27 Interior del recipiente luego del proceso de raspado (scrape).....	62

Figura 28 Interior del recipiente luego del proceso de raspado húmedo (scrape).....	62
Figura 29 Interior del recipiente luego de una limpieza completa	63
Figura 30 Distribución (Histograma) – OD600 del sobrenadante de centrifugación.....	64
Figura 31 OD600 Scrape Ajustado – Datos individuales.....	64
Figura 32 Distribución (Histograma) – Pureza (SDS-Page) Etapa IEC.....	65
Figura 33 %Pureza Scrape Ajustado – Datos individuales	65
Figura 34 Distribución (Histograma) – OD600 del sobrenadante de centrifugación.....	67
Figura 35 OD600 Modificación Flujo Alimentación – Datos individuales	67
Figura 36 Distribución (Histograma) – Pureza (SDS-Page) Etapa IEC.....	68
Figura 37 %Pureza Modificación Flujo Alimentación – Datos individuales.....	68
Figura 38 Comparación de masa por ciclo de centrifugación	70
Figura 39 OD600nm (off line) – Modificación Carga Recipiente	71
Figura 40 OD600nm (turbidímetro) – Modificación Carga Recipiente.....	71
Figura 41 Caudal y Peso de Producto (sistema de control) – Modificación Carga Recipiente...	72
Figura 42 Distribución (Histograma) OD600nm – 12 ciclos de centrifugación	74
Figura 43 OD600nm 12 Ciclos – Datos individuales.....	74
Figura 44 Distribución (Histograma) %Pureza – 12 ciclos de centrifugación.....	75
Figura 45 %Pureza 12 Ciclos – Datos individuales	75
Figura 46 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos individuales.....	78
Figura 47 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos promedio	78
Figura 48 %Pureza Comparación entre experimentos – Datos promedio.....	79
Figura 49 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos promedios	80
Figura 50 OD600nm vs %Pureza.....	80

Abreviaturas

EMA: European Medicines Agency

FDA: Food and Drug Administration

GMP: Good Manufacturing Practices

HBsAg: Antígeno de Hepatitis B

IEC: Ion Exchange Chromatography

MTECH: Manufacturing Technology (Tecnología de Procesos)

OD600nm: Optical Density 600 nanometers

PEG: Polietilenglicol

RESUMEN

1. Resumen

El presente trabajo fue realizado en la planta de producción del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) del laboratorio Sanofi ubicado en el parque industrial de Pilar, en donde el mismo es sintetizado para luego ser exportado a la planta ubicada en Marcy l'Etoile, Francia. En estas instancias, se logra el producto final, la cual es una vacuna pediátrica hexavalente que se encuentra ampliamente distribuida a varios países del mundo, incluida Argentina. El proceso de producción recientemente escalado debido a la demanda de la vacuna se encuentra atravesado por el concepto de mejora continua, es por eso que el equipo de Tecnología de Proceso (MTECH – Manufacturing Technology), el cual es considerado el dueño del proceso de elaboración, a la búsqueda de diferentes estrategias con el objetivo de optimizar etapas y mejoras en el rendimiento del proceso. Este estudio se llevó a cabo sobre una de las etapas de purificación de la proteína de interés cuyo sistema de expresión es a través de cultivos de levaduras, llamada “Precipitación con PEG” cuyo fin es obtener un sobrenadante libre de contaminantes (proteínas y restos celulares). En base a la información obtenida de bibliografía sobre la teoría de la centrifugación y en la experiencia previa sobre el proceso de producción, los ensayos planteados consistieron en modificaciones de parámetros de configuración de los equipos utilizados, en este caso la centrífuga (centrífuga continua, modelo CARR® Powerfuge® P12), así como también modificaciones de parámetros de proceso tales como la velocidad de alimentación y la cantidad de producto procesado en cada ciclo de centrifugación. La industria farmacéutica está altamente regulada y es por eso por lo que los procesos de elaboración de medicamentos están registrados y aprobados por las autoridades regulatorias de los países en donde se comercializan y el margen de acción para realizar modificaciones en los procesos de producción está acotados a los rangos aprobados. A pesar de las limitaciones que significa aplicar reformas en el desarrollo de un fármaco por fuera los rangos permitidos, los resultados obtenidos en los distintos estudios llevados a cabo fueron promisorios en cuanto a que se lograron mejoras en la etapa de centrifugación respecto del punto de partida. De esta manera, el proceso (scrape regulado) pudo ser incorporado de manera definitiva al proceso de producción en el laboratorio lo que significó una reducción del valor de OD600nm de 0,323 u.a. (de 1,286 a 0,963 u.a.) y un aumento del porcentaje de pureza de IEC de 1,1% (de 74,94 a 76,01%). Así mismo, otros datos obtenidos brindaron cierta información empírica permitiendo conocer cómo se

comporta el proceso de elaboración frente a cambios en los parámetros de proceso y como posibles mejoras a implementar en un futuro, por ejemplo, la implementación del proceso de 12 ciclos de centrifugación permitiría reducir el valor de OD600nm en 0,491 u.a. (de 1,286 a 0,795 u.a.) y consecuentemente un incremento del porcentaje de IEC de 4,0% (de 74,94 a 78,97%).

INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1. Biotecnología y producción de medicamentos

La biotecnología ha logrado grandes avances en los últimos años en diferentes campos de aplicación tales como la agricultura, el medio ambiente y en la industria y en particular en la industria farmacéutica. En este campo permitió diseñar fármacos innovadores para el tratamiento de varias enfermedades, y el futuro es aún más promisorio debido a los descubrimientos que ocurren día a día gracias a la inversión que compañías y estados, tal como es el conocido y actual caso de COVID-19 en dónde se logró el desarrollo y producción de vacunas en tiempos nunca visto. La importancia de los fármacos biológicos se evidencia en el tipo de tratamientos en que se utilizan, por ejemplo, diversos tipos de cáncer, enfermedades crónicas como la artritis reumatoide (AR), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la psoriasis, la uveítis, la espondilitis anquilopoyética y la esclerosis múltiple, entre otras [1].

El éxito en el tratamiento de las distintas terapias en las que los medicamentos biotecnológicos son utilizados condujo a un aumento en el número de aprobaciones realizadas tanto por la FDA como así también por la EMA. Además, debido a la eficacia que éstos presentan se generan nuevas expectativas para los pacientes que han modificados los rankings de ventas dentro de la industria farmacéutica. Por otro lado, se abre un campo de trabajo importante tanto en las nuevas estrategias de tratamientos que pueda ofrecer una mayor probabilidad de respuesta terapéutica y mejor tolerabilidad para cada paciente, como en la optimización de los procesos de elaboración a fin de mejorar los costos productivos y poder ofrecer así ofrecer medicamentos más accesibles [2].

Los medicamentos biológicos ofrecen opciones de tratamiento para pacientes con enfermedades crónicas y, a menudo, incapacitantes, como diabetes, enfermedades autoinmunes y cáncer. La mayoría de los medicamentos biológicos de uso clínico actual contienen sustancias activas hechas de proteínas. Estos pueden diferir en tamaño y complejidad estructural, desde proteínas simples como la insulina o la hormona del crecimiento hasta otras más complejas como los factores de coagulación o los anticuerpos monoclonales [4].

La producción de biofármacos tuvo sus orígenes cuando Herbert Boyer (investigador de la Universidad de California en Los Ángeles -UCLA) y uno de los fundadores de la empresa biofarmacéutica Genentech, descubrieron la forma natural de

cortar y unir segmentos de ADN de diferentes orígenes, lo cual significó una verdadera revolución en la industria. Poco tiempo después se sumaron los anticuerpos monoclonales (mAbs), descubiertos por el argentino César Milstein con su colega George Köhler, como alternativa para el tratamiento oncológico, y más tarde apareció una nueva generación de biofármacos que se diseñan de acuerdo con el perfil genómico de cada paciente lo que nos lleva a la denominada medicina personalizada [5].

Los productos biológicos están regulados por agencias regulatorias de los países en donde son comercializados, por ejemplo, FDA y EMA, son una categoría diversa de productos y son moléculas que pueden ser producidas a través de la biotecnología en un sistema vivo, como un microorganismo, una célula vegetal o una célula animal y, a menudo, son más difíciles de caracterizar que los pequeños fármacos moleculares. Ejemplos de productos aprobados por la FDA son las proteínas terapéuticas (como filgrastim), anticuerpos monoclonales (como adalimumab) y vacunas (como las de influenza y tétanos) [6].

Existen claras diferencias entre las características que poseen los biofármacos y los fármacos convencionales, por ejemplo, presentan una estructura molecular mucho más compleja y mayor tamaño. Estas diferencias pueden resultar beneficiosas logrando mejoras en los tratamientos o limitaciones que afectan la farmacodinamia o estimulación de respuestas inmunes. Además, la naturaleza proteica de éstos genera un desafío adicional al momento de seleccionar la vía de administración ya que la vía oral trae aparejados problemas de degradación por proteólisis, por lo cual la mejor opción es la administración por vía parenteral, inyección intramuscular, subdérmica o mediante infusión intravenosa. La administración subdérmica mediante autoinyección presenta grandes ventajas, por ejemplo la simplificación de la aplicación y consecuentemente el sostenimiento del tratamiento por parte de los pacientes, lo que ha llevado al desarrollo de una gama de dispositivos de autoinyección, incluyendo jeringas prellenadas, bolígrafos prellenados y dispositivos de inyección electrónica, para responder a las necesidades del paciente mejorando potencialmente la adherencia y, por lo tanto, los resultados del tratamiento a largo plazo [3].

2.2. Vacunas

Según la definición de Akhil (2021), “una vacuna se describe como un microorganismo inactivado o atenuado o una parte de este (ácido nucleico, proteína) que, una vez administrada al huésped, estimula una respuesta protectora de la célula dentro del sistema, o una sustancia biológica inmunitaria diseñada para proporcionar protección específica contra una determinada enfermedad” [7].

A partir de los avances en ingeniería genética, se ha logrado ampliar las posibilidades de emplear bacterias y otros microorganismos para producir proteínas de importancia económica, médica e industrial. A pesar de estos avances, aproximadamente 7 de cada 100 vacunas que se analizan en los laboratorios y son testeadas en animales de experimentación, llegan a la fase de ensayos clínicos en humanos, y 1 de cada 5 de estas demuestran tener utilidad real. Es por esto que se necesita iniciar una gran cantidad de desarrollos para aumentar la chance de obtener vacunas que resulten útiles y demuestren ser seguras y eficaces para los grupos demográficos a los que se pretende dar prioridad [8].

Los procesos de producción se pueden clasificar en función de si utilizan microorganismos completos (virus o bacterias), fragmentos del agente patógeno o solamente el material genético que contiene la información necesaria para la producción de las proteínas de interés [8].

2.2.1. Tipos de vacunas

Dependiendo del tipo de metodología utilizada para su obtención, las vacunas pueden ser clasificadas de la siguiente forma:

- Vacunas atenuadas
- Vacunas inactivadas
- Vacunas de subunidad recombinante
- Vacunas de toxoide

Vacunas atenuadas:

Estas vacunas provocan una fuerte respuesta inmunitaria y duradera, ya que su poder de acción se asemeja a la infección natural que ayudan a prevenir. En su mayoría

brindan protección de por vida contra un patógeno y la enfermedad que causa con solo una o dos dosis. Actualmente, existe una variedad de vacunas vivas atenuadas en uso, por ejemplo, sarampión, polio (vacuna Sabin), rotavirus, viruela, tuberculosis, varicela zoster (varicela), fiebre amarilla [10].

Vacunas inactivadas:

Una vacuna inactivada está compuesta por microorganismos (virus o bacteria) enteros, inactivados por procedimientos químicos o físicos, o bien por fracciones de éstos (partes proteicas como toxoides o subviriones, polisacáridos puros o conjugados) para estimular el sistema inmunológico y proteger el cuerpo de enfermedades que debido al tratamiento de inactivación ya no pueden replicarse ni causar enfermedades. Algunos ejemplos incluyen Hepatitis A, influenza, encefalitis japonesa, rabia, fiebre tifoidea, etc [10].

Los procedimientos químicos o físicos empleados en la inactivación de los microorganismos presentan ventajas y desventajas, por ejemplo, las condiciones operativas en el empleo de formaldehído o β -propiolactona pueden causar modificaciones estructurales en los microorganismos. En el caso de los métodos que emplean radiación, por ejemplo UV, presenta un desafío en la industria de las vacunas debido a los efectos que causa su aplicación. En el caso de inactivación por rayos gamma es muy rápido y eficaz, pero sus efectos secundarios sobre la estructura del virión pueden limitar su aplicación en el campo de la vacunación [11].

Vacunas de subunidad recombinante

Mediante técnicas de ingeniería, los genes que codifican para las proteínas de interés (antígenos) se pueden introducir y expresar en bacterias, levaduras o células de mamíferos. Entonces, una proteína recombinante es aquella que se expresa como parte de un constructo generado por clonación molecular en un sistema biológico. Generalmente estas proteínas se expresan en sistemas biológicos en los que naturalmente no existe su síntesis, por lo que es una información genética nueva que se expresa empleando la maquinaria biosintética de la célula que contiene el constructo. Luego de insertado el gen de interés, el sistema de expresión comienza a producir dichas proteínas en grandes cantidades, las cuales son recolectadas y purificadas para producir la vacuna de interés. La producción de proteínas recombinantes ha abierto una gran frontera para la obtención

de organismos como “biofábricas” que sintetizan proteínas recombinantes de interés biotecnológico [10].

Vacunas de toxoide

Un toxoide es una sustancia derivada de la toxina liberada por una bacteria, la cual es modificada para eliminar la capacidad de producir la enfermedad y se utiliza como antígeno en una vacuna. El toxoide se adsorbe en sales de aluminio o calcio, que actúan como adyuvantes para mejorar la respuesta inmunológica, por ejemplo el toxoide tetánico y el toxoide diftérico [10].

Nuevas vacunas

Durante las últimas tres décadas, la transcripción in vitro se ha convertido en una técnica generalizada para diseñar y preparar ARN mensajero (ARNm). Desde 2019, la atención en este campo se ha centrado en la prevención de enfermedades infecciosas con vacunas de ARNm debido a la aparición del SARS-CoV-2. El término "vacuna de ARNm" se refiere al tipo de vacunas que liberan una proteína antigénica en forma de ARNm. Desde las primeras pruebas de concepto sobre estas vacunas en la década de 1990, se ha pensado que ofrecen más ventajas que las convencionales: vacunas de subunidades, recombinantes, vivas atenuadas e inactivadas. El fundamento de estas vacunas se basa en introducir un fragmento de ARNm que contiene la información genética para elaborar un pequeño fragmento de una proteína que se encuentra en la membrana externa del virus. De este modo, las células producen la proteína viral, y como parte de una respuesta inmunitaria normal, el sistema inmunitario reconoce que la proteína es extraña y produce proteínas especializadas llamadas anticuerpos. La primera ventaja importante de las vacunas de ARNm es el perfil de seguridad y la segunda la eficacia. Dado que las vacunas de ARNm liberan antígenos esenciales, promueven el desarrollo de una inmunidad adaptativa más específica para el antígeno y minimizan los efectos adversos en comparación con las vacunas de células completas. Además, la farmacología de las vacunas de ARNm ofrece el desarrollo de respuestas inmunitarias celulares y respuestas de anticuerpos, que pueden ser útiles para tratar enfermedades que requieren inmunidad mediada por células, como el cáncer [9].

2.3. Vacuna contra Hepatitis B

El trabajo de Hong Zhao (2020) establece que “La vacunación contra la Hepatitis B es la estrategia más eficaz para controlar la infección causada por el virus de Hepatitis B (VHB). La primera vacuna autorizada se desarrolló mediante la purificación del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) del plasma de portadores asintomáticos de HBsAg. Luego, la tecnología del ADN recombinante permitió el desarrollo de la vacuna contra la Hepatitis B recombinante a partir de la cual se logra una protección a largo plazo (más de 30 años) con la aplicación de 3 dosis. A finales de 2018, 189 países adoptaron el programa de vacunación universal contra la Hepatitis B, que ha reducido drásticamente la prevalencia mundial de HBsAg en niños <5 años del 4,7 % en la era previa a la vacunación al 1,3 % en 2015. Sin embargo, la implementación de la vacunación universal contra la Hepatitis B en algunas regiones es subóptima por lo que se deben realizar más esfuerzos para superar los desafíos sociales y económicos y lograr así la vacunación mundial óptima” [12].

2.3.1. Hepatitis B

La Hepatitis B es causada por un virus (VHB) que provoca una inflamación del hígado y se estima que 296 millones de personas viven con infección crónica por Hepatitis B [13] (la Figura 1 muestra la prevalencia en el mundo). En 2019 esta enfermedad provocó 820.000 muertes, principalmente por complicaciones como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. En su etapa aguda, generalmente se asocia con pérdida de apetito, debilidad, náuseas, dolor abdominal, ictericia, erupción cutánea y dolor en las articulaciones [13].

La vacuna, la cual se administra en combinación con otras pediátricas, puede ayudar a prevenir la infección y el desarrollo de enfermedades crónicas y cáncer de hígado [14].

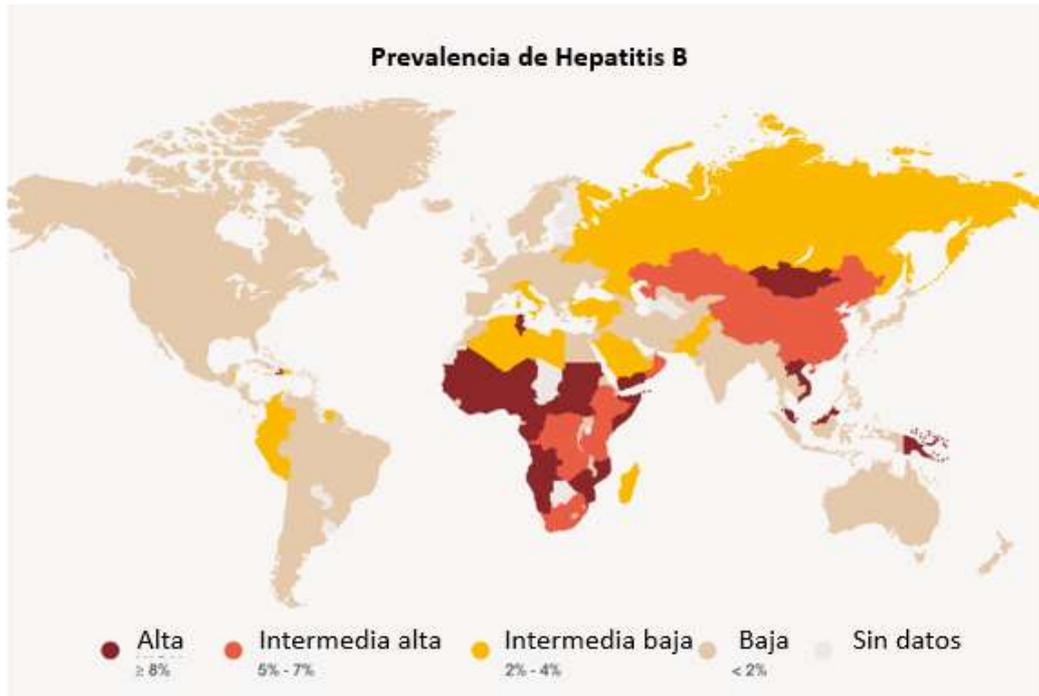
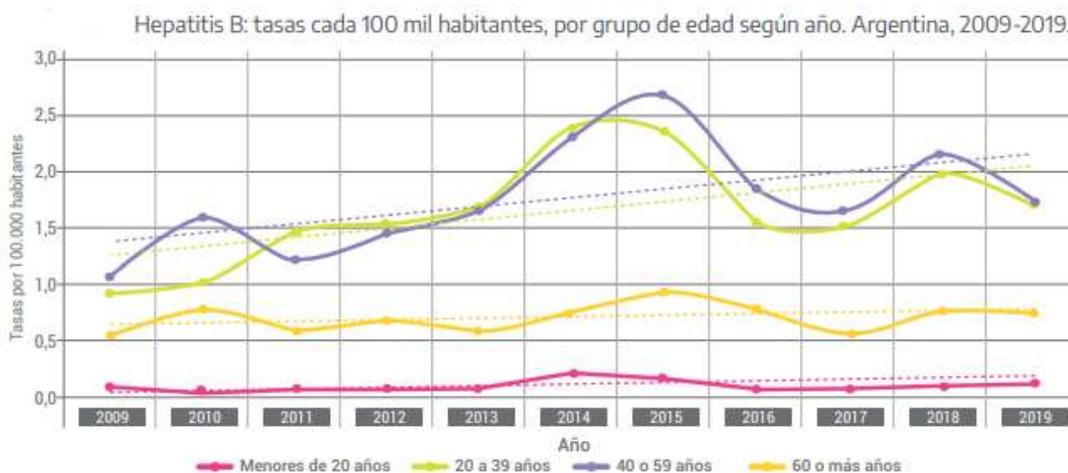


Figura 1 Prevalencia de Hepatitis B, extraído de SchweitzerA. (2015)

2.3.2. Vacuna y Hepatitis B en Argentina

De acuerdo con el boletín epidemiológico N°2 sobre las Hepatitis Virales en la Argentina del Ministerio de Salud, los casos y tasas de notificación de Hepatitis B para el total del país muestran un aumento hasta el 2015, con una mediana de 437 casos anuales, un mínimo de 257 y un máximo de 641. La tasa de casos cada 100.000 habitantes fue de 0,64 en el 2019, 1,49 en 2015 y en los últimos tres años se ubica alrededor de 1/100 mil [16].



FUENTE: Elaboración propia del Área de Vigilancia de la Salud de la Dirección Nacional de Epidemiología en base a datos del SNVS.

Figura 2 Hepatitis B en Argentina, extraído de Boletín N°2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020)

La Figura 2 muestra una tendencia en ascenso de la Hepatitis B en la población entre 20 y 59 años y un muy bajo número de casos entre menores de 20 años, debido a la incorporación de la vacuna contra el VHB en el calendario nacional y su aplicación a recién nacidos. La estrategia de vacunación fue cambiando a través del tiempo y regulada por diferentes leyes [16]:

- En el año 1992 (Ley Nacional N° 24.151/92) se comienza a vacunar al personal de salud y a los grupos de riesgo.
- En el año 2000 (Resolución N° 940/00 del Ministerio de Salud) se incorporó la vacuna para recién nacidos con el esquema 0-2-6 meses.
- En el año 2003 (Resolución N° 175/03) se incorporó la vacuna en preadolescentes (11 años) no inmunizados con anterioridad. Esta estrategia tuvo como objetivo intervenir en el momento previo al inicio de conductas consideradas de riesgo para la adquisición del VHB.
- En el año 2009 (Resolución N° 773/2008), se incorpora la vacuna combinada quintuple DTP-Hib-HB (denominada “pentavalente” – quintuple) a los 2, 4 y 6 meses de vida (Figura 3).
- Finalmente, en 2012 se inicia la vacunación universal contra la Hepatitis B.



Figura 3 Calendario de Vacunación, extraído de Boletín N° 2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020)

Si bien el esquema de vacunación en Argentina en recién nacidos se encuentra por encima del 70% (Figura 4), se necesita reforzar la tasa de cobertura en especial en la población mayor de 20 años que no haya sido previamente vacunada, para lo cual toma

relevancia la política de vacunación universal y gratuita contra la Hepatitis B promovida desde 2012 [16].

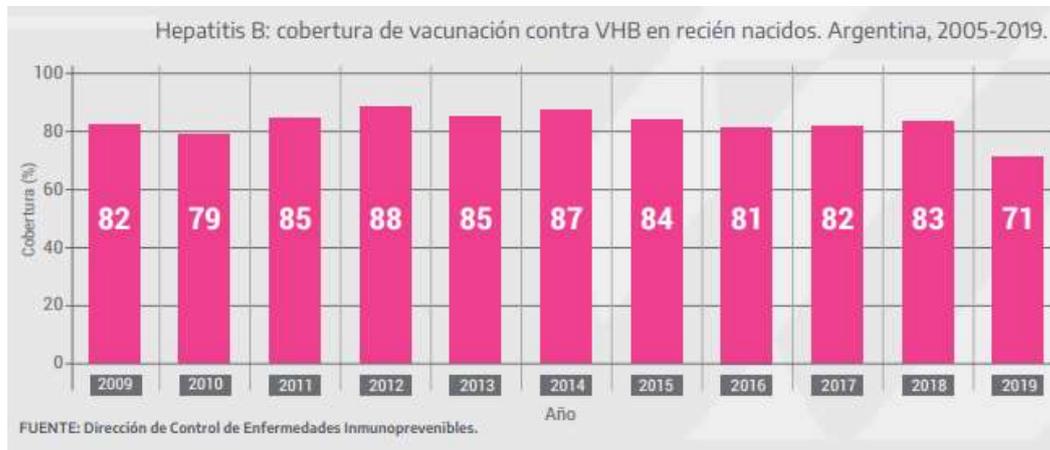


Figura 4 Cobertura de Vacunación en Argentina, extraído de Boletín N° 2 de Hepatitis Virales en Argentina (2020)

En lo que respecta a la cobertura de la vacunación, si bien se ha avanzado significativamente y se observa una baja en las tasas de casos cada 100.000 habitantes, el Ministerio de Salud recomienda realizar acciones intensivas dirigidas a individuos pertenecientes a grupos en riesgo, a saber [16]:

- Trabajadores de salud
- Personas hemodializadas
- Personas politransfundidas
- Personas con hepatopatías crónicas
- Hombres que tienen sexo con hombres
- Personas privadas de la libertad y trabajadores de las cárceles
- Personas heterosexuales con relaciones no monogámicas
- Usuarios de drogas endovenosas
- Personas con VIH/SIDA
- Convivientes y parejas de personas con Hepatitis B

Con respecto a la comercialización de vacunas en el mercado argentino, se encuentran disponibles en la forma farmacéutica inyectable tanto en solución como liofilizado de 7 compañías farmacéuticas [17].

2.4. Proceso de elaboración de HBsAg

Si bien el proceso elaboración del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) es conocido y ampliamente difundido en bibliografía pública, existen pasos, parámetros o información del proceso que por razones de confidencialidad no pueden ser difundidos. Es por esto y a los fines de una comprensión general del proceso de elaboración que se lo describe en forma genérica tomando como fuente la bibliografía disponible.

La producción del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) ha sido desarrollada a partir de diferentes sistemas de expresión tales como levaduras, bacterias, células de insectos, plantas, células animales y animales transgénicos. La elaboración del antígeno a partir de *Escherichia coli* como sistema de expresión es simple y de bajo costo, en comparación con otros sistemas de expresión, pero la proteína resultante no es adecuada para el uso farmacéutico debido al inadecuado plegamiento lo que compromete su efectividad. Por otro lado, la producción de HBsAg en levaduras combina la fácil manipulación desde el punto de vista genético, las modificaciones post-traduccionales con alta tasa de productividad y un bajo costo de manufactura [18].

2.4.1. Proceso de producción de HBsAg derivado de *Hansenula polymorpha*

La producción de HBsAg en *Hansenula polymorpha* ocurre en varios pasos que se enumeran a continuación:

Pasos de Producción del Antígeno (Upstream):

- 1- Pre-cultivo inicial
- 2- Fermentación industrial
- 3- Lavado celular

Pasos de Purificación (Downstream):

- 4- Ruptura celular
- 5- Clarificación
- 6- Adsorción
- 7- Cromatografía de intercambio iónico
- 8- Ultrafiltración
- 9- Ultracentrifugación
- 10- Cromatografía de exclusión molecular

11- Filtración esterilizante

2.4.2. Fermentación y lavado celular

El proceso de elaboración del antígeno de Hepatitis B se inicia a partir de un cultivo de la cepa de producción criopreservada (working seed lot). El objetivo de esta etapa es la producción de biomasa y del antígeno (intracelular) a través de una ampliación de 2 fermentadores, que consiste en un fermentador de 5 L primero, para inocular el fermentador principal de 50 L. La etapa de fermentación se realiza sin limitación de oxígeno, produciendo una biomasa de más de 10 g de peso de células secas por L en 55 h. La Figura 5 muestra cómo se desarrolla el proceso de fermentación industrial el cual ocurre en 2 etapas: primero, el cultivo inicial se realiza con alimentación de glicerol en modo alimentado (fed-batch) y luego alimentación semicontinua de glicerol controlada por el nivel de oxígeno disuelto. Mientras que la primera fase de este cultivo se realiza para obtener altas densidades celulares, el propósito de la segunda fase es activar el promotor que controla la expresión del gen HBsAg. Por lo tanto, la concentración de glicerol baja se mantiene mediante la alimentación controlada por oxígeno. La activación da como resultado altos niveles de HBsAg intracelular, y la adición de metanol por pulsos en la fase de fermentación final aumenta la cantidad de producto producido. Una vez alcanzada la biomasa esperada, se inicia el paso siguiente que consiste en el lavado celular. Esta etapa consiste en aplicar filtración de flujo tangencial para eliminar los componentes del medio y se intercambian por el buffer, obteniéndose una suspensión celular concentrada con una densidad celular mucho más alta que el cultivo final, lo que permite una disminución sustancial en el tiempo de proceso requerido para la ruptura celular [18].

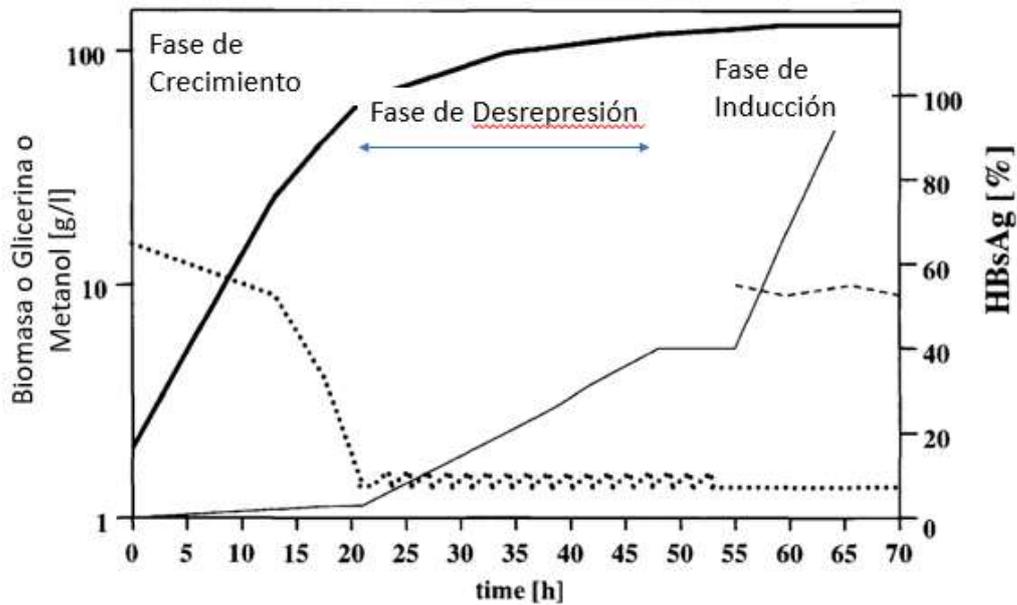


Figura 5 Fermentación de HBsAg, extraído de Gellinsen G. (2002)

2.4.3. Purificación (downstream processing)

La primera etapa del proceso de purificación es la disrupción celular mecánica para la liberación del producto de las células, lo cual requiere el uso de un homogeneizador de alta presión. Existen otros métodos para producir la disrupción celular, pero se encontró que con esta metodología, la cantidad de producto liberado por gramo de células secas es sustancialmente mayor en comparación con los procesos de molienda. Previo a la disrupción celular, debe adicionarse al medio inhibidores de proteasas para bloquear la acción de éstas y evitar así que degraden a la proteína de interés. También se debe agregar detergente para solubilizar las partículas antigénicas. A continuación, se prosigue con las etapas de clarificación y adsorción, la cuales consisten en sucesivas centrifugaciones a alta velocidad en centrífugas continuas en donde de la primera centrifugación se recupera el sobrenadante, previo tratamiento con polietilenglicol. En la centrifugación siguiente, el objetivo es retener el pellet o sedimento constituido por la proteína de interés adsorbida a una matriz adecuada (dióxido de silicio). Mientras que el HBsAg se une casi cuantitativamente, solo alrededor del 10% de las proteínas totales del huésped precipitan junto con las partículas de antígeno. Todos los pasos de centrifugación ocurren bajo condiciones de proceso controladas (parámetros críticos de proceso) [18].

Los pasos posteriores, la cromatografía de intercambio iónico y la ultrafiltración, están diseñados para reducir aún más el volumen y eliminar la mayor parte de los lípidos derivados del huésped. Dado que el principio activo, la partícula HBsAg, es una mezcla de pequeños antígenos de superficie integrados en la estructura de la membrana del huésped, el contenido de lípidos es una característica importante que debe controlarse durante la purificación. La ultracentrifugación produce un gradiente de concentración salina (cloruro de cesio o bromuro de potasio) en donde las partículas se acumulan en una banda distinta, que se puede identificar visualmente como una fracción de producto de color marrón. De esta etapa se recupera la banda con el antígeno y se prosigue con el último paso de la purificación, una cromatografía de filtración en gel diseñada para eliminar la sal de la etapa anterior y posibles agregados de antígeno. La separación de las partículas de HBsAg se controla a través de la conductividad y la absorbancia UV. El HBsAg purificado se formula por adsorción a un adyuvante de hidróxido de aluminio y adición de un conservante [18].

2.5. Purificación de proteínas

La biotecnología combina áreas como la genética, la biología, la química y procesos innovadores, de gran aplicación en salud, agricultura y medioambiente, y en industrias como la de producción de alimentos y biocombustibles. La creciente demanda en los distintos campos de aplicación exige desarrollar métodos de purificación de proteínas eficientes y rápidos. Sin embargo, el costo total de producción de proteínas es extremadamente alto, y las etapas de purificación constituyen una parte sustancial de ese costo total. La comprensión de los métodos de purificación y la optimización de las condiciones experimentales son fundamentales a fin de minimizar los costos de producción y al mismo tiempo satisfacer la calidad y todos los requisitos regulatorios [19].

Las etapas de downstream de un proceso de fabricación son aquellas destinadas a la separación, purificación y acondicionamiento final del producto de interés conservando su actividad biológica y su integridad química. [20, 21]. Obtener un producto de elevada pureza implica que la proteína debe estar libre no solo de contaminantes (como por ejemplo, ácidos nucleicos, virus, pirógenos, proteínas residuales de la célula huésped,

medios de cultivo celular), sino también de las diversas isoformas, que se originan a partir de modificaciones postraduccionales [22 – 23].

Las técnicas para purificar proteínas se basan en maximizar las diferencias en las propiedades químicas, estructurales o funcionales como son la carga, el peso molecular, la hidrofobicidad, la especificidad por algún ligando, afinidad de unión a ligandos, unión a metales, asociación reversible, modificaciones postraduccionales y secuencias o estructuras específicas principalmente. Por esto es fundamental conocer en profundidad todas o la mayor parte de estas propiedades para precisar los pasos a seguir en un protocolo de purificación. Sin embargo, algunas proteínas pueden ser muy difíciles de purificar en una forma activa y estable, por ejemplo, proteínas integrales de membrana, complejos de proteínas inestables, proteínas producidas como agregados insolubles y proteínas con un conjunto específico de modificaciones postraduccionales [19].

2.5.1. Proceso de separación sólido – líquido

Tal como se mencionó en el punto anterior, las etapas de purificación de las proteínas son importantes debido a que representan un alto porcentaje del costo total del proceso de manufactura. Es por esta razón que conocer en detalle cada uno de estos pasos y comprender las variables que los rigen para introducir mejoras, representa una ventaja económica no solo por disminuir los costos de producción sino también porque permitirá mejorar la calidad y pureza de las proteínas.

Este trabajo tiene por objetivo optimizar una etapa del downstream del proceso de elaboración del antígeno del virus de Hepatitis B, más precisamente una de las etapas de centrifugación. Debido a esto, se presenta a continuación la teoría que rige dicha operación unitaria.

2.5.2. Fundamentos del método de centrifugación

La separación centrífuga es una operación de sedimentación acelerada por la fuerza centrífuga. Así, un requisito previo para la separación es una diferencia de densidad entre las fases. Esto se aplica tanto a la separación sólido-líquido como líquido-líquido. Para el caso de este estudio, el resultado de la aplicación del método de centrifugación es la obtención de dos fases, el sedimento y el sobrenadante. El primero está compuesto por partículas de impurezas que se desean desechar y la segunda fase (el sobrenadante o

clarificado) está compuesto principalmente por el líquido de menor peso específico, el cual presenta un aspecto turbio debido a la presencia del antígeno de Hepatitis B soluble [24, 25].

La velocidad de sedimentación Vg de una partícula sólida bajo la influencia de la gravedad está dada por la ley de Stokes:

$$Vg = \frac{\rho_p - \rho_f}{18 \cdot \mu} \cdot d_p^2 \cdot g \quad [24]$$

En donde:

ρ_p : densidad de la partícula (Kg/m³)

ρ_f : densidad del fluido (Kg/m³)

μ : viscosidad dinámica del fluido (mPa·s)

d : diámetro de la partícula (m)

g : aceleración gravitatoria (9,81 m/s²)

Cuando esta partícula está sometida al campo centrífugo, la velocidad de sedimentación cambia a:

$$Vc = Vg \cdot Z \quad [24]$$

donde Z es la fuerza centrífuga relativa (FCR) o número G .

$$Z = \frac{r \cdot \omega^2}{g} \quad [24]$$

En donde:

r : radio equivalente (m)

ω : Velocidad de rotación (rad/s)

En esta ecuación se identifican las variables que intervienen en la rapidez de sedimentación de las partículas, observándose que existe una relación directamente proporcional con el diámetro y densidad de las partículas y del líquido, el radio de giro y la velocidad angular, mientras hay una relación inversamente proporcional con la viscosidad del líquido. Además, la eficiencia o performance depende también del tiempo de residencia de la partícula, el cual es afectado por el caudal de alimentación o el volumen del rotor del equipo de centrifugación [24].

2.5.3. Centrífugas continuas

A diferencia de una centrífuga de laboratorio donde la muestra a procesar se coloca en recipientes separados, una centrífuga continua permite una alimentación y descarga continuas, mediante la alimentación de una corriente constante de material que ingresa al aparato centrífugo en donde por efecto de la fuerza centrífuga se logra la separación de los materiales contenidos en la alimentación, y se descarga continuamente por la salida de la centrífuga (Figura 6) [24].

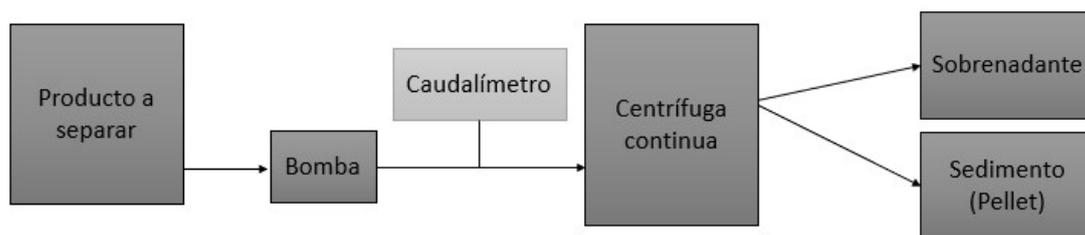


Figura 6 Esquema de trabajo con una centrífuga continua

El rotor de la centrífuga se llena por medio de una bomba que toma el producto desde el recipiente dador y luego comienza a girar hasta alcanzar la velocidad de trabajo. Las partículas sedimentan en el rotor (pellet) y el sobrenadante sale empobrecido de partículas (clarificado). Este proceso continúa hasta que se satura la capacidad del rotor o la muestra es procesada completamente. Por lo tanto, la cantidad de muestra que puede ser procesada dependerá del volumen y concentración de partículas que esta contenga [24].

2.5.4. Tipos de centrífugas

Existen dos tipos principales de centrífugas dependiendo del principio de separación (i) la filtración centrífuga y (ii) la sedimentación centrífuga. La filtración centrífuga es una combinación de filtración con centrifugación, para lo cual el equipo que se utiliza es una centrífuga de canasta. Para el proceso de sedimentación centrífuga existe una variada gama de equipos: centrífuga tubular, centrífuga de cámara múltiple, centrífuga de tazón de sólidos, centrífuga de tornillo o decantadora y centrífuga de discos [24].

El equipo utilizado en el proceso de producción de Hepatitis B y objeto del presente estudio es una centrífuga tubular.

2.5.5. Centrífuga tubular

La centrífuga tubular es la centrífuga continua de diseño más sencillo (Figura 7).

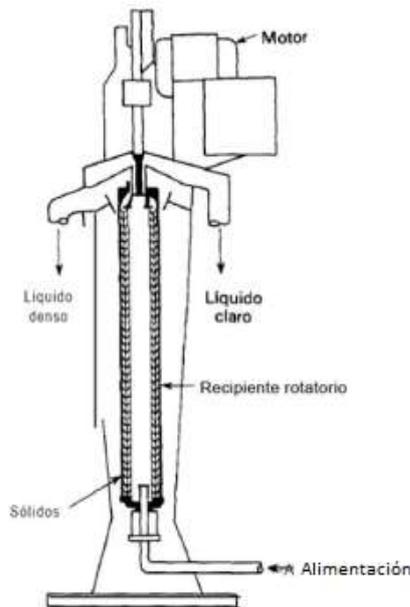


Figura 7 Esquema de una centrífuga tubular - Grasselli M. (2015)

El rotor está formado por un tubo cuya longitud es varias veces su diámetro lo que le permite alcanzar aceleraciones muy elevadas (de 12.000 a 30.000 G). La mayor parte de los sólidos se sedimenta sobre el rotor o tazón, mientras que la fase líquida sale por la parte superior de la centrífuga [24].

2.5.6. Determinación del flujo óptimo de alimentación en una centrífuga continua

El caudal de alimentación óptimo (Q) es otro de los parámetros importantes a optimizar en un proceso de centrifugación continua puesto que de él depende el tiempo de residencia y puede ser determinado de dos maneras: (i) experimental o (ii) por cálculo [24].

En el primer caso se analiza experimentalmente el grado de clarificación de una muestra al fluir por una centrífuga continua a diferentes caudales

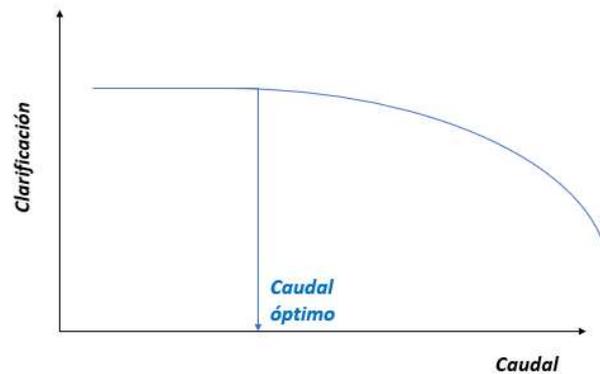


Figura 8 Caudal óptimo, extraído de Steinebach F. (2016)

El caudal óptimo (Q) será aquel con el cual se obtengan las condiciones deseadas del sobrenadante (

Figura 8). Respecto a la segunda opción, para calcular el Q óptimo se debe cumplir que el tiempo de sedimentación (T_s) \leq al tiempo de residencia (T_R) para lograr la separación de una partícula de un determinado diámetro (D_p).

Los experimentos en el presente trabajo relacionados con el caudal óptimo fueron determinados de manera empírica.

2.6. Producción de la vacuna de Hepatitis B en Argentina (Sanofi)

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en la planta de producción del laboratorio Sanofi (Figura 9) ubicada en el parque industrial de Pilar (34°24'58.9"S 58°58'36.1"W). El sitio Pilar produce el antígeno de Hepatitis B el cual es exportado a Francia en donde se elabora el producto terminado, una vacuna pediátrica hexavalente, la cual es distribuida a varios países del mundo incluida la Argentina. Esta vacuna hexavalente es completamente líquida, lista para usar, de uso pediátrico, que protege contra Hepatitis B, difteria, tétanos, pertussis, infecciones invasivas por Hib (*Haemophilus influenzae* tipo b) y poliomielitis [26].



Figura 9 Sanofi Pasteur Sitio Pilar. Planta de producción del HBsAg, extraído de página de Sanofi

OBJETIVOS

3. Objetivos generales

El objetivo general del trabajo fue la optimización correspondiente a una de las etapas de centrifugación del proceso de producción del antígeno Hepatitis B (HBsAg) logrando un proceso más estable y reproducible, es decir, mejorando la reproducibilidad de éste, lo cual permite mejorar el perfil de calidad de la proteína producida.

Se trabajó con el proceso de elaboración del antígeno de Hepatitis B de escala industrial, actualmente utilizado en el Laboratorio Sanofi Pasteur. El mismo luego de ser sintetizado en la planta de Pilar es exportado a otra planta de producción ubicada en Marcy l'Etoile, Francia, en donde se realiza la elaboración del producto terminado, una vacuna pediátrica hexavalente. Debido a la demanda mundial de la vacuna, el proceso de producción del antígeno fue escalado en un factor de 5, motivo por cual se analizaron los datos históricos del proceso antes del escalado (proceso base) para tomarlos como referencia y se compararon con los datos del proceso luego del escalado (proceso escalado).

Los objetivos específicos que se plantearon para mejorar las etapas de purificación del proceso de elaboración del antígeno utilizado en la producción de la vacuna contra la Hepatitis B son los siguientes:

1. Reducir el valor de OD600nm del sobrenadante obtenido en la etapa de Precipitación con polietilenglicol (PEG) del proceso de purificación del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) de la etapa de downstream I.
2. Incrementar el porcentaje de pureza de la proteína luego de la etapa de purificación cromatográfica de intercambio iónico (IEC) de la etapa de downstream II.
3. Mejorar la calidad del producto previo a etapa de IEC para mejorar la vida útil de la resina cromatográfica.
4. Implementar las mejoras identificadas en el proceso de elaboración de lotes comerciales del antígeno de Hepatitis B en Sanofi.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales y métodos

4.1. Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B

Todos los ensayos fueron realizados sobre lotes de escala industrial de producción del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) los cuales se producen en un entorno regulado de buenas prácticas de fabricación (BPF o del inglés GMP: Good Manufacturing Practices) lo que implica contar de equipos de fabricación que se encuentran debidamente calificados y bajo un sistema de calidad que asegura el estado de mantenimiento y calibración periódica.

El antígeno de Hepatitis B (HBsAg) se produce en una levadura recombinante mediante pasos sucesivos de fermentación, cosecha, purificación y maduración. Este antígeno existe como una partícula compuesta de proteínas y lípidos. El componente proteico es la pequeña proteína de superficie (proteína S) del virus de la Hepatitis B, que es una proteína de membrana de unos 25 kDa. El componente lipídico está formado por lípidos de la levadura, principalmente fosfolípidos [27].

Las etapas del proceso de producción del HBsAg se dividen en tres fases principales:

- Fase upstream: Esta fase está diseñada para permitir la producción de HBsAg a partir de las células de *Hansenula polymorpha*. El proceso de fermentación está definido para permitir la producción de alta densidad celular y la síntesis de HBsAg en condiciones totalmente controladas.
- Fase I (Downstream I - DSI): Durante esta etapa, el HBsAg se libera de la levadura a través del proceso de disrupción celular. El antígeno se separa de los restos celulares y se purifica parcialmente para su posterior procesamiento a través de la Fase II.
- Fase II (Downstream II - DSII): Durante esta etapa, el HBsAg se purifica mediante dos pasos cromatográficos, intercambio aniónico y de exclusión molecular, y un paso de ultracentrifugación. Al final de las etapas de purificación, se produce la maduración con el propósito de asegurar la formación de todos los enlaces disulfuro intra e intermolecular y mejorar la reproducibilidad del proceso en términos de maduración.

Tabla 1 Esquema del proceso de producción

Orden	Fase	Paso de proceso	Objetivo
1	Upstream	Pre-cultivos I y II	Aumento de biomasa
2		Fermentación industrial	Aumento de biomasa y producción de HBsAg
3		Lavado celular	Reemplazo medio de cultivo
4	Downstream	Ruptura celular	Liberación del HBsAg intracelular
5		Precipitación con PEG*1	Eliminación del debris celular y retención del sobrenadante
6		Adsorción y lavado	Retención y lavado del HBsAg
7		Desorción	Separación del HBsAg de la matriz de adsorción
8		Clarificación	Eliminación de la matriz de adsorción
9		Cromatografía de intercambio iónico (IEC)	Eliminación de proteínas y ADN de <i>Hansenula polymorpha</i>
10		Concentración	Ajuste de volumen
11		Ultracentrifugación	Eliminación de lípidos y proteína solubles por gradiente de densidad
12		Diafiltración	Eliminación de sal
13		Concentración	Ajuste de volumen
14		Cromatografía de exclusión molecular (SEC)	Eliminación de potenciales agregados
15		Filtración final	Reducción de bioburden
16		Maduración	Formación final de puentes disulfuros

*1 De todos los pasos que componen el proceso de elaboración del antígeno de Hepatitis B, el trabajo del presente estudio se llevó a cabo sobre el paso de Precipitación con PEG, el cual describe en detalle en el punto siguiente.

4.2. Precipitación con PEG (paso 5)

El objetivo principal de esta etapa es eliminar los restos celulares y las impurezas de las proteínas de la célula huésped (HCP) mediante la precipitación con una solución de polietilenglicol (PEG). Bajo temperatura controlada, el extracto celular crudo proveniente de la ruptura celular, se diluye con un buffer de lavado celular, se añade cloruro sódico y soluciones de PEG para obtener una concentración final de PEG proporcional al peso celular seco, permitiendo que los restos celulares y las impurezas precipiten. Luego se continúa con la obtención del sobrenadante de PEG a partir del proceso de centrifugación. El pellet de este proceso es desechado (Figura 10) [30].

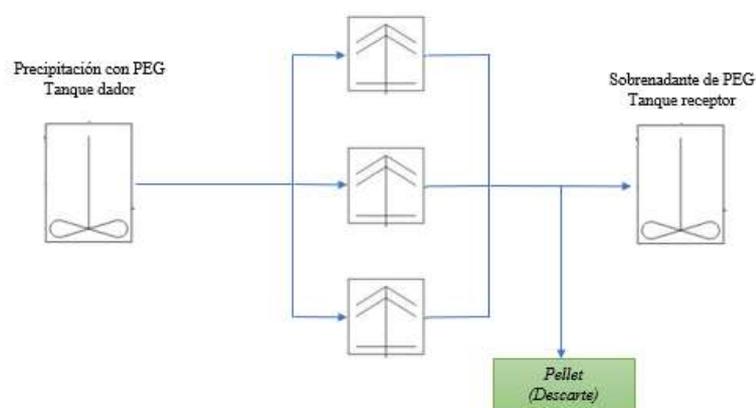


Figura 10 Esquema de la etapa de Precipitación con PEG

Para la etapa de centrifugación del producto se utilizan centrífugas CARR Centritech Powerfuge P12 de Pneumatic Scale Angelus (Figura 11) ubicadas en la sala de Downstream I del área productiva de Sanofi planta Pilar. Este tipo de centrífuga de flujo continuo llega a velocidades de hasta 500 L/hora para lotes de hasta 4000 L. En este sistema, las fuerzas centrífugas de 20.000 g permiten la separación incluso de partículas submicrónicas. Los sólidos localizados en el interior del equipo se eliminan periódicamente con un ciclo de raspado (scrape) completamente automatizado [30].



Figura 11 Equipo de centrifugación CARR, extraído de psangelus.com

Los parámetros que rigen el proceso de centrifugación son los siguientes:

Tabla 2 Parámetros de proceso de la etapa de Precipitación con PEG (base vs escalado)

Parámetro	Proceso base	Proceso escalado
Velocidad	10.500 rpm	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0.5 kg/min	0.5 kg/min
Nº scrape	3	3
Nº de centrífugas	1	3
Nº ciclos de centrifugación	2	3
Nº total de ciclos de centrifugación	2	9
Producto procesado por ciclo	Ciclo 1: 40 kg Ciclo 2: 60 kg	Ciclo 1 y 2: 50 kg Ciclo 3: 60 kg

4.3. Controles de Proceso

Durante el proceso de fabricación del antígeno de Hepatitis B se realizan varios controles de proceso con el fin de asegurar que el lote en proceso transcurre dentro de los parámetros esperados. En esta sección se describen los dos (2) controles de proceso que están alineados con los objetivos del presente trabajo, la densidad óptica (OD_{600nm}) del

sobrenadante de PEG y la pureza por SDS PAGE luego de la etapa de cromatografía de intercambio iónica (IEC) [30].

4.3.1. Densidad óptica del sobrenadante de PEG

Para evaluar la calidad del sobrenadante obtenido y la reproducibilidad lote a lote, una vez finalizado el proceso de centrifugación, se toma una muestra desde el tanque receptor (Figura 10) para medir el valor de OD600nm y verificar que esté dentro del rango apropiado antes del siguiente paso.

La muestra se obtiene a través del toma-muestra incorporado en la parte inferior del tanque receptor y luego se mide la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca Shimadzu UV-1800 (Figura 12) ubicado en la sala de Downstream I sin necesidad de dilución alguna. Esta medición es realizada por técnicos entrenados en el área de Producción.



Figura 12 Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, extraído de jenck.com

El valor de OD600nm obtenido se compara con el criterio de aceptación para verificar que la etapa Precipitación con PEG se encuentra dentro de los parámetros establecidos. Un valor de OD600nm que se supera el criterio de aceptación es indicativo de que la etapa no fue eficiente, pudiendo repercutir en las siguientes etapas del proceso, por ejemplo, pudiendo comprometer el valor de pureza esperado en la etapa de IEC (Etapa 9 en Tabla 1) [30].

4.3.2. Pureza por SDS PAGE

Una vez finalizada la etapa de purificación por cromatografía iónica, personal de Producción toma una muestra representativa del lote y la envía al departamento de Control de Calidad de Sanofi planta Pilar para la determinación de pureza por SDS PAGE.

La determinación de la pureza del antígeno de Hepatitis B (HBsAg) se realiza mediante el ensayo de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en condiciones reductoras. Los polipéptidos que constituyen la proteína de HBsAg son desnaturalizados por calentamiento de la muestra en el buffer de SDS (agente desnaturalizante). Los puentes disulfuros de la proteína se rompen en presencia del agente reductor ditioneitol (DTT). Por último, el SDS iguala la carga de las proteínas, otorgándole carga negativa, permitiendo su migración hacia el ánodo. Los polipéptidos migran a través del gel de SDS-PAGE de acuerdo con sus pesos moleculares. Después de la corrida, se revela el gel mediante la tinción con azul de Coomassie. Los pesos moleculares se determinan por sus posiciones respectivas en el gel en comparación con las del preparado de peso molecular conocido. Con un escáner se mide la intensidad de coloración de las bandas reveladas. La suma de las bandas que corresponden a los polipéptidos del HBsAg constituye el porcentaje de pureza [31].

Equipos:

- Image Scanner III GE Healthcare con PC asociada
- Unidad de electroforesis horizontal Multiphor II Amersham
- Generador de corriente EPS 3500 Pharmacia Biotech
- Circulador termostático Multi Temp III Amersham
- Baño de calor seco
- Centrífuga para tubo eppendorf
- Agitador rotativo tridimensional
- Agitador magnético

Reactivos utilizados:

- Solución de albúmina bovina sérica 5% en cloruro de sodio 0.7%. Sigma Aldrich catálogo A4628
- TRIS (base). J.T. Baker catálogo 4109-02
- Dithiothreitol (DTT). USB catálogo 15397

- Marcadores de bajo peso molecular rango (14.4 – 97.0 kDa). LMW GE Healthcare catálogo 17-0446-01
- Brilliant blue R. Sigma Aldrich catálogo B7920
- Metanol. Merck catálogo 1.00063
- Dodecil sulfato de sodio. BIO RAD catálogo 161-0302
- Azul de bromo fenol. Sigma Aldrich catálogo B8026
- ExcelGel SDS Homogeneous 12.5. GE Healthcare catálogo 80-1261-01
- ExcelGel SDS buffer strips. GE Healthcare catálogo 17-1342-01
- Agua purificada
- Etanol 96%. Alcoholera Flavia

4.4. Proceso base y escalado: Obtención de valores de OD600nm y %Pureza en IEC

4.4.1. Proceso base: Determinación de OD600nm y %Pureza en IEC

Con el objetivo de establecer el valor de referencia de OD600nm del sobrenadante de la etapa Precipitación con PEG (Etapa 5 de la Tabla 1) y el %Pureza (Etapa 9 de la Tabla 1) se analizaron con el software Minitab®, los datos históricos de 130 lotes comerciales previo al escalado del proceso (Proceso base). A continuación, se describen las herramientas de Minitab® utilizadas en el presente trabajo [32].

- ***Histograma***

Se utiliza para examinar la forma y dispersión de los datos. El histograma divide los valores de la muestra entre muchos intervalos y representa la frecuencia de los valores de datos en cada intervalo con una barra [32].

- ***Gráfico de dispersión (Scatterplot)***

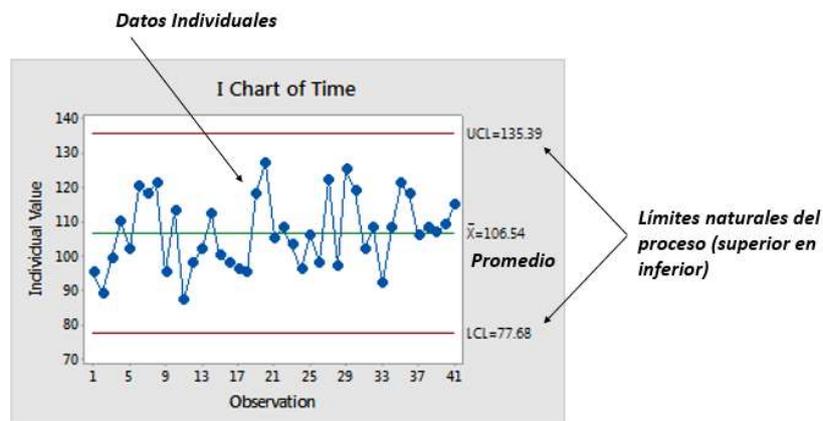
Se usa para investigar la relación entre un par de variables continuas. Un diagrama de dispersión muestra pares ordenados de variables X e Y en un plano de coordenadas. Después de crear un diagrama de dispersión, se puede agregar una línea de regresión ajustada y elegir un modelo de regresión lineal, cuadrático o cúbico [32].

- **Análisis de regresión**

El análisis de regresión genera una ecuación que describe la relación estadística entre uno o más predictores y la variable de respuesta y para predecir nuevas observaciones. La regresión lineal generalmente utiliza el método de estimación de cuadrados mínimos ordinarios, del cual se obtiene la ecuación al minimizar la suma de los residuos al cuadrado [32].

- **Carta o gráfico de control (individual)**

Se utiliza para monitorear la media de un proceso que tenga datos continuos y que sean observaciones individuales. Este gráfico de control brinda información sobre la estabilidad del proceso a lo largo del tiempo para que se puedan identificar y corregir las inestabilidades en un proceso. La carta de control muestra el valor promedio de los datos y los límites naturales del proceso, por lo tanto, un proceso se considera estable cuando todos los datos individuales están contenidos dentro los límites naturales del proceso y éstos se encuentran dentro de los límites de especificación, en caso de que los hubiera [32].



4.4.2. Proceso de escalado: Determinación de OD600nm y %Pureza en IEC

Utilizando las herramientas del software Minitab® se analizaron los datos OD600nm de la etapa de Precipitación con PEG y %Pureza de IEC de los primeros catorce (14) lotes de escala comercial luego del escalado. Debido a que estos valores diferían de los de referencia (Proceso base) se planteó la necesidad de realizar

modificaciones y/u optimizaciones en la etapa de Precipitación con PEG con el fin de lograr reducir el valor de OD600nm e incrementar el %Pureza de IEC.

4.5. Optimización de la etapa de Precipitación con PEG

Debido a que el proceso de producción del antígeno de Hepatitis B se encuentra registrado en las distintas agencias regulatorias en donde se comercializa el producto, las opciones para realizar modificaciones en los lotes de escala industrial se encuentran restringidas al registro del proceso comercial, es decir que los parámetros a modificar o sus rangos no pueden superar los límites aprobados en el registro de fabricación [20].

Los experimentos postulados surgieron de la bibliografía consultada y desarrollada en 2.5 Purificación de proteínas, de propuestas realizadas en las reuniones del equipo de Tecnología de Proceso (MTECH – Manufacturing Technology) y de la experiencia obtenida del Proceso base. Estos experimentos son:

- Mejora en la eliminación de sólidos remanentes (Scrape): experimento 1
- Modificación del flujo de alimentación de la centrífuga: experimento 2
- Modificación de la carga en el recipiente de centrifugación: experimento 3

4.5.1. Mejora en la eliminación de sólidos remanentes (Scrape): experimento 1

Finalizado en ciclo de centrifugación, en el recipiente de la centrífuga quedan adheridos sólidos que deben ser removidos porque en cada centrífuga se realizan tres ciclos de centrifugación en forma continua y los sólidos remanentes pueden influir negativamente en el ciclo siguiente, ya sea porque reducen la capacidad del recipiente o porque pueden afectar la eficacia de la centrifugación, provocando un aumento del valor de OD600 del sobrenadante.

La eliminación de los sólidos remanentes en el proceso base se realiza mediante el raspado o scrape seco, función automática incorporada en el equipo de centrifugación. El proceso de raspado o scrape seco se realiza una vez finalizado el ciclo de centrifugación para eliminar restos de sólidos remanentes del recipiente del equipo. Éste consiste en acercar un brazo dentado a las paredes del recipiente de centrifugación mientras gira logrando eliminar el sólido adherido.

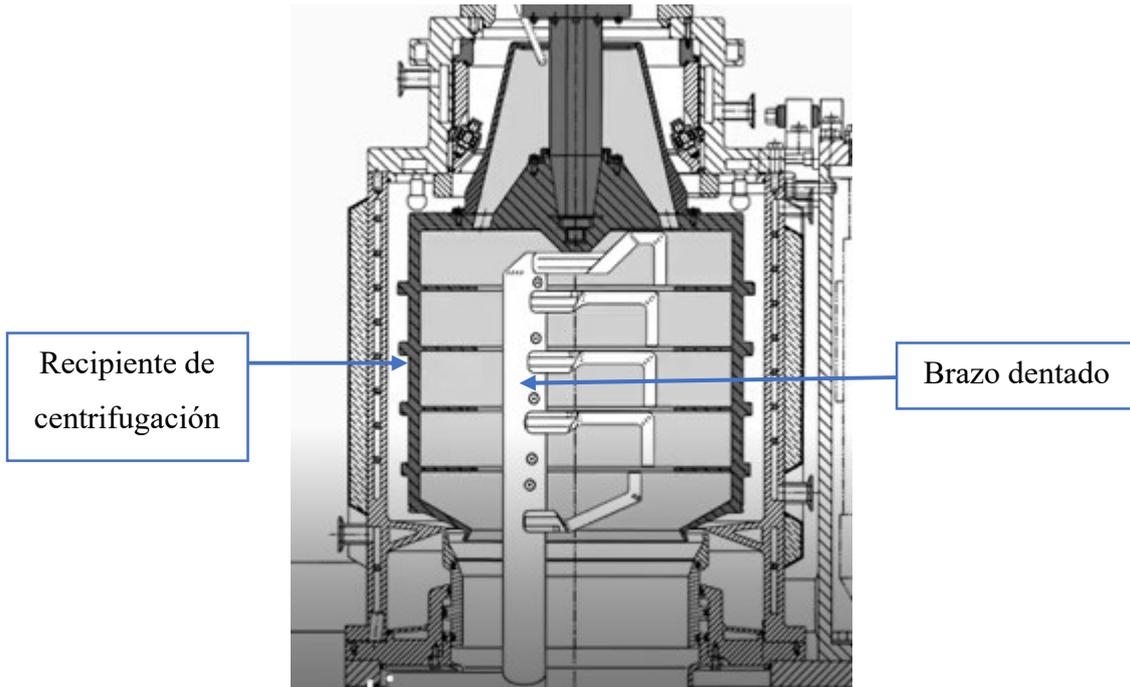


Figura 13 Vista interior de recipiente de centrifuga y sistema de raspado, extraído de psangelus.com

Al comparar el proceso de raspado entre el proceso base y el escalado, se observó que la distancia entre los dientes del brazo dentado y la pared del recipiente de centrifugación era 2 – 3 mm mayor en el proceso escalado que en el base. Esta mayor distancia resulta en una menor eficiencia en la remoción de sólidos por lo cual, controlando y regulando esta distancia puede mejorar la eficiencia del proceso.

Las opciones que se exploraron para mejorar la eliminación de los sólidos fueron i) disminución de la distancia entre los dientes de raspado y la pared del recipiente de centrifugación, ii) la ejecución de un raspado húmedo, es decir realizar una inyección de agua a través de los dientes del brazo mientras se realiza el raspado y iii) la limpieza completa del recipiente de centrifugación.

Para este experimento se mantuvieron los parámetros de proceso constante y se implementó un procedimiento para controlar y regular el proceso de raspado (scrape).

Tabla 3 Parámetros de proceso, ensayo mejora eliminación de sólidos (scrape)

Parámetro	Valor
Velocidad	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0,5 kg/min
Nº scrape	3
Nº de centrífugas	3
Nº ciclos de centrifugación	3
Nº total de ciclos de centrifugación	9
Masa procesada por ciclo	Ciclo 1 y 2: 50 kg Ciclo 3: 60 kg

4.5.2. Modificación de flujo de alimentación: experimento 2

El aumento del tiempo de centrifugación produce un incremento de la separación sólido líquido. En otras palabras, al incrementar el tiempo de residencia se favorece el proceso de separación [33].

En este experimento se redujo el caudal de alimentación de 0,50 kg/min a 0,45 kg/min, reducción del 10%, con el objetivo de aumentar el tiempo de residencia y así favorecer el proceso de separación.

Tal cual se describió en el punto 2.5.6, la búsqueda de caudal óptimo, es decir aquel con el cual se obtiene el menor valor de OD600 nm en el sobrenadante de PEG, se realizó de forma empírica.

La Figura 14 representa el fundamento del experimento realizado.

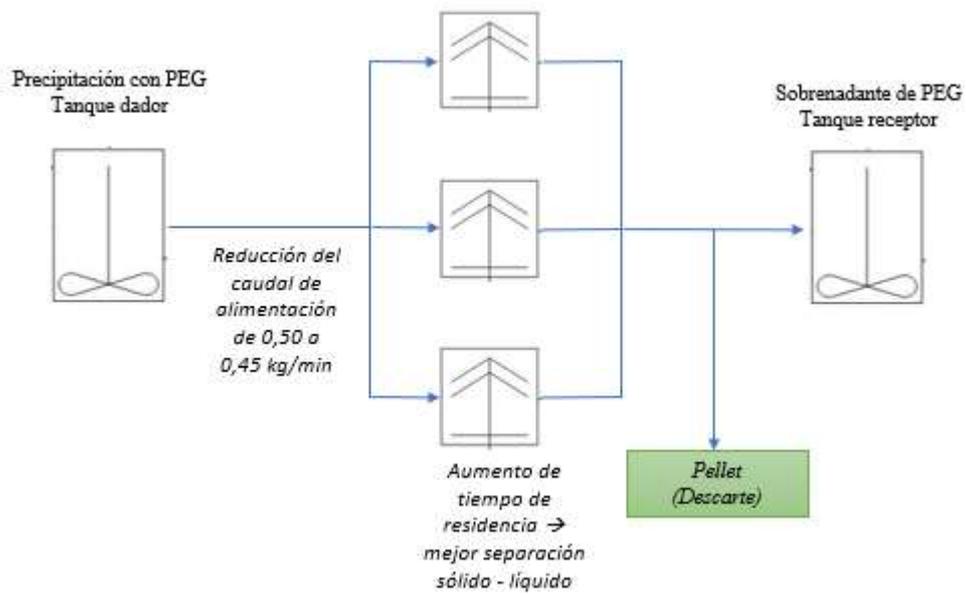


Figura 14 Esquema ensayo modificación del flujo de alimentación

En este ensayo solo se modificó el caudal de alimentación, mientras que el resto de los parámetros de proceso se mantuvieron constante.

Tabla 4 Parámetros de proceso, ensayo modificación flujo de alimentación

Parámetro	Valor
Velocidad	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0,45 kg/min
Nº scrape	3
Nº de centrifugas	3
Nº ciclos de centrifugación	3
Nº total de ciclos de centrifugación	9
Masa procesada por ciclo	Ciclo 1 y 2: 50 kg Ciclo 3: 60 kg

4.5.3. Modificación de la carga en el recipiente de centrifugación: experimento 3

Este experimento se basó en la hipótesis que la cantidad de producto procesada en cada ciclo de centrifugación excede la capacidad operativa o capacidad óptima del equipo.

4.5.3.1. Evaluación de la carga en cada ciclo de centrifugación

Para este análisis se evaluaron los datos históricos del Proceso base (130 lotes) y del Proceso Escalado (14 lotes) para lo cual se extrajo de la base de datos de procesos los pesos cargados en las centrifugas en cada uno de los ciclos de centrifugación. Cabe señalar que en el Proceso base se utilizaba una (1) centrifuga y dos (2) ciclos de centrifugación por lote y en el Escalado tres (3) centrifugas y tres (3) ciclos de centrifugación por lote. Con los datos de los pesos se realizó un gráfico de barras en Excel® mostrando la masa de producto procesada por ciclo en cada uno de los procesos. De este análisis se estableció como hipótesis, considerando la eficiencia de remoción de sólidos (scrape) en ciclos de centrifugación, que procesar 50 kg de producto en los ciclos 1 y 2 en cada centrifuga en el Proceso escalado podría resultar en una acumulación de sólidos entre ciclos, resultando un aumento del valor de OD600nm al final de la etapa debido a la sobrecarga del recipiente de la centrifuga.

A continuación, se resumen los parámetros de proceso de la etapa precipitación con PEG del Proceso base y escalado.

Tabla 5 Parámetros de proceso, ensayo modificación de la carga en el recipiente de centrifugación

Parámetro	Proceso base	Proceso escalado
Velocidad	10.500 rpm	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0,50 kg/min	0,50 kg/min
Nº de centrifugas	1	3
Nº ciclos de centrifugación	2	3
Nº total de ciclos de centrifugación	2	9
Masa procesada por ciclo	Ciclo 1: 38 - 41 kg Ciclo 2: 60 - 65 kg	Ciclo 1 y 2: 50 kg Ciclo 3: 60 kg

Adicionalmente, con el objetivo de confirmar el postulado anterior, se realizaron las siguientes acciones sobre un total de nueve (9) lotes (Figura 15):

- i. Mediciones off-line de OD600nm en el tanque receptor tomando muestras al principio, medio y fin de cada ciclo de centrifugación.
- ii. Se colocó un turbidímetro en línea en la salida de una de las centrifugas para medir la turbidez del sobrenadante resultante en forma on-line.

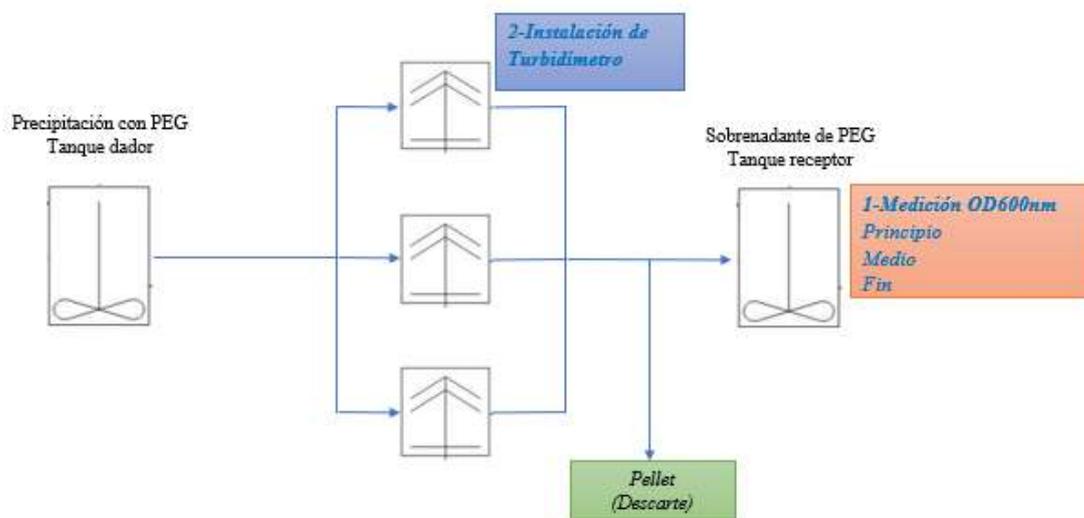


Figura 15 Esquema ensayo modificación de la carga en el recipiente de centrifugación

4.5.3.2. Disminución de la carga por aumento del número de ciclos

Una vez que se demostró que el valor de OD600nm es proporcional a la cantidad de producto procesado en cada ciclo de centrifugación, es decir que a mayor cantidad de producto mayor es el valor de OD600nm obtenido, se incrementó la cantidad de ciclos totales de nueve (9) a doce (12).

A continuación, se resumen los parámetros de proceso de la etapa de centrifugación (Tabla 6 Parámetros de proceso – 9 vs 12 ciclos Tabla 6) y la distribución del producto centrifugado por ciclo (Figura 16).

Tabla 6 Parámetros de proceso – 9 vs 12 ciclos

Parámetro	3 ciclos	4 ciclos
Velocidad	10.500 rpm	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0,50 kg/min	0,50 kg/min
Nº de centrifugas	3	3
Nº ciclos de centrifugación	3	4
Nº total de ciclos de centrifugación	9	12
Masa procesada por ciclo	Ciclo 1 y 2: 50-55 kg Ciclo 3: 60-65 kg	Ciclo 1, 2 y 3: 40 kg Ciclo 4: 40-50 kg

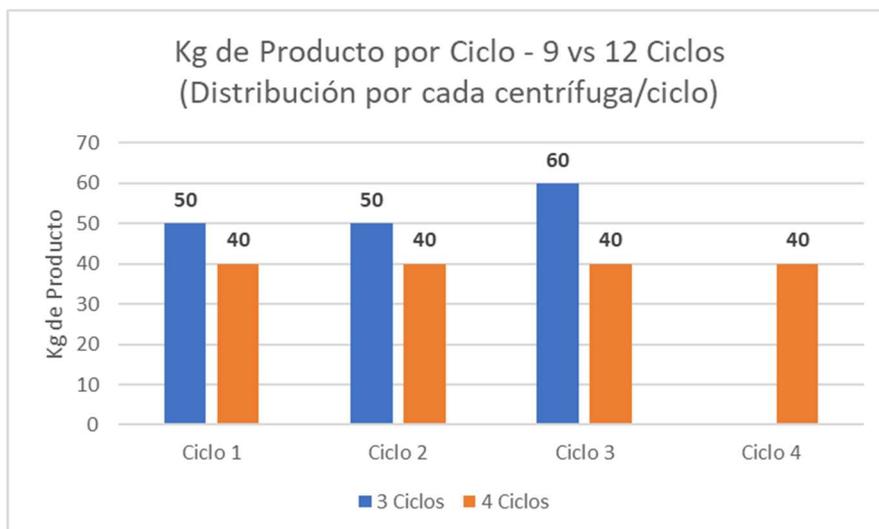


Figura 16 Producto procesado 9 vs 12 ciclos – Modificación Carga Recipiente

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

5. Discusión y resultados

5.1. Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B – Proceso base

En primera instancia, se presentan y analizan los datos históricos del proceso de producción del antígeno de Hepatitis B denominado como “base” a fin de establecer la referencia de comparación para el proceso denominado como “escalado”, previo y a posteriori de las modificaciones realizadas sobre éste, con el fin de mejorar la eficiencia de la etapa de precipitación con PEG.

Para este análisis se toma como referencia la última campaña de producción del Proceso base, la cual consta de 130 lotes comerciales. Los parámetros analizados son:

- Valor de OD600nm de la etapa de Precipitación con PEG
- Valor de Pureza de la etapa de IEC

En Anexo 1: Proceso base – valores de OD600nm y pureza de IEC, se muestran los datos individuales del resultado de OD600nm de los 130 lotes del proceso base. El histograma (Figura 17) muestra que existen dos (2) poblaciones de datos.

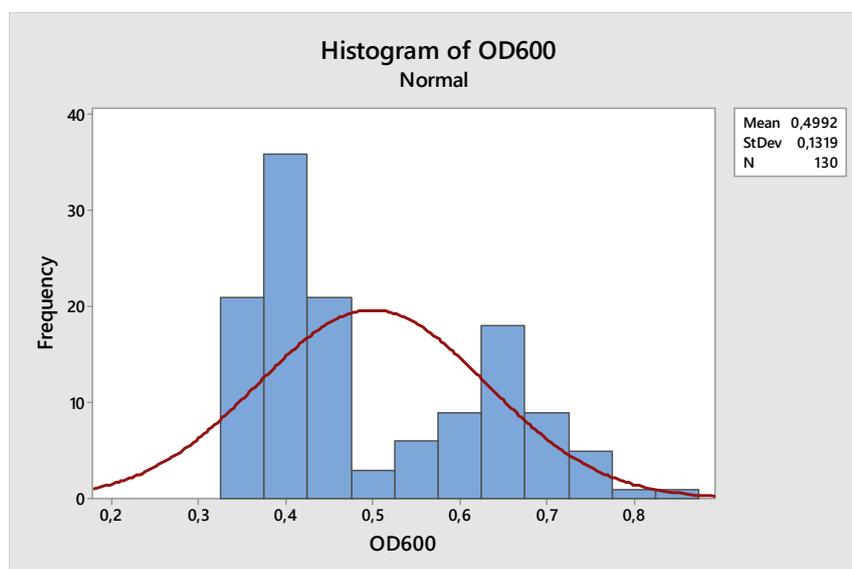


Figura 17 Histograma OD600nm – Proceso base

Para la elaboración del antígeno en el Proceso base se utilizaba una centrífuga por lote, contando en ese momento con dos equipos equivalentes [34]. Al analizar los datos segmentados por equipo, se observa cada población corresponde a cada una de las centrífugas (Figura 18).

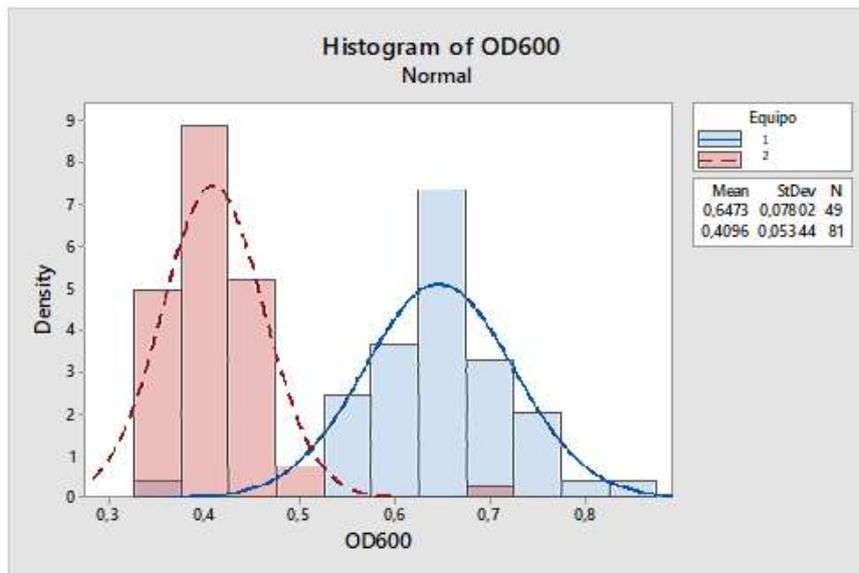


Figura 18 Histograma OD600nm – Proceso base segmentado por centrifuga

Finalmente, para establecer el valor de OD600nm de referencia se calculó el promedio con los valores individuales de los 130 lotes que conformaron la campaña de elaboración del proceso base.

Tabla 7 Proceso base – Densidad óptica de referencia

OD600nm					
Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Base	130	0,499	0,132	0,840	0,330

A continuación, se muestra el histograma (Figura 19) de los resultados de pureza de la etapa de IEC del Proceso base. Los datos individuales se encuentran en el Anexo 1: Proceso base – valores de OD600nm y pureza de IEC.

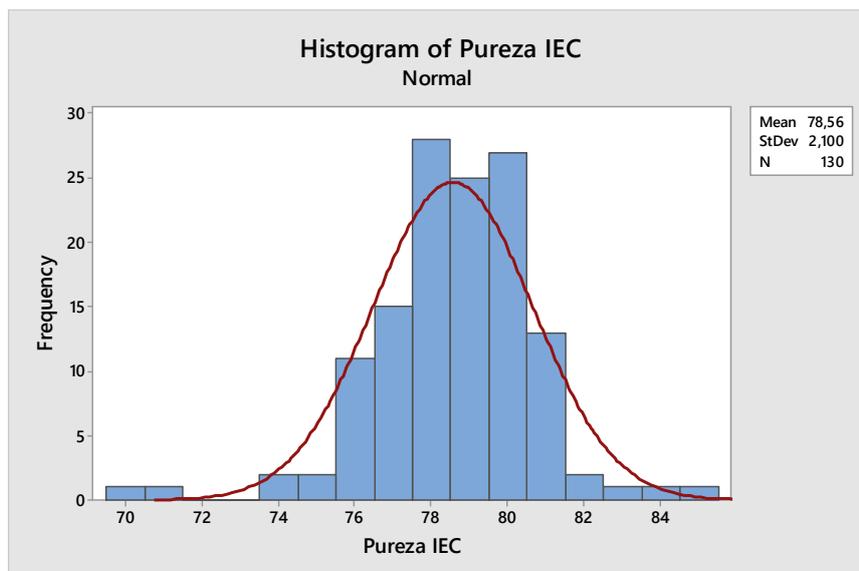


Figura 19 Histograma Pureza etapa de IEC (%) – Proceso base

Tabla 8 Proceso base – Pureza de IEC (%) de referencia

Pureza de IEC					
Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Base	130	78,56	2,10	85,03	70,06

Se utilizaron las herramientas de Minitab 17 “Scatterplot” y “Regression Analysis” [32] para investigar la relación entre el valor de OD600nm de la etapa de Precipitación con PEG y el porcentaje de pureza de la etapa de IEC. Se genera un diagrama de dispersión, y se agrega una línea de regresión ajustada a partir de un modelo de regresión lineal.

Este diagrama de dispersión muestra que, existe una relación inversa entre el valor de OD600nm en el sobrenadante de centrifugación de la etapa Precipitación con PEG (X), el porcentaje de pureza de la etapa de IEC (Y) (Figura 20).

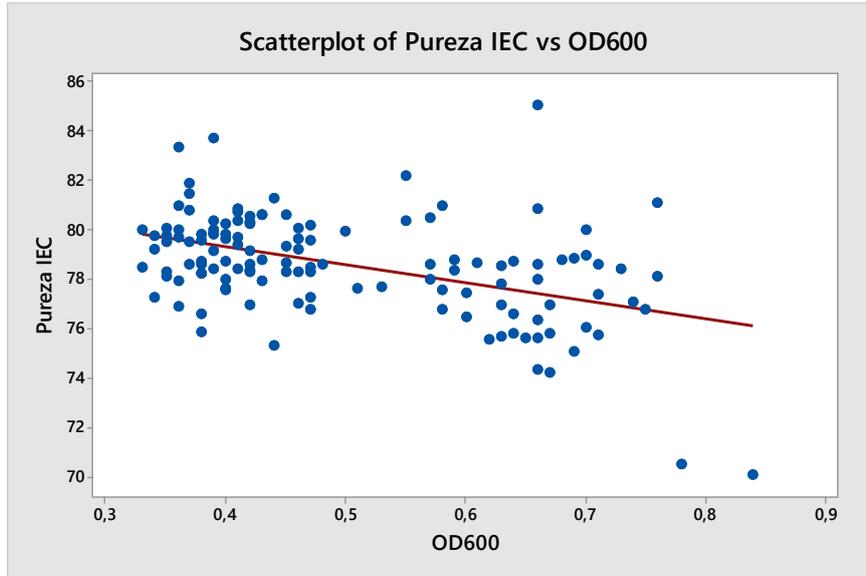


Figura 20 Relación entre OD600nm en etapa Precipitación con PEG y el porcentaje de Pureza en etapa de IEC

Tabla 9 OD600nm vs %Pureza – Análisis de regresión lineal

Regression Analysis: Pureza IEC versus OD600

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	118,5	118,500	33,66	0,000
OD600	1	118,5	118,500	33,66	0,000
Error	128	450,6	3,521		
Lack-of-Fit	39	185,1	4,747	1,59	0,037
Pure Error	89	265,5	2,983		
Total	129	569,1			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,87634	20,82%	20,20%	17,12%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	82,186	0,646	127,15	0,000	
OD600	-7,26	1,25	-5,80	0,000	1,00

Regression Equation

$$\text{Pureza IEC} = 82,186 - 7,26 \text{ OD600}$$

Nota: el análisis de regresión lineal fue realizado utilizando el software Minitab®

A modo de resumen, en la siguiente tabla se recopilan los resultados de los controles de proceso de interés para el presente estudio:

Tabla 10 Proceso base – Valores de referencia

Parámetro	Valor
OD600 nm	0,4992 u.a.
Pureza en IEC	78,56 %
Correlación Pureza de IEC vs OD600	20,82%

El análisis estadístico muestra que la correlación entre la pureza en la etapa de IEC y el valor de OD600nm es 20,82%, y la experiencia sobre el proceso indica que una reducción en el valor de OD600nm no solo mejora el resultado de pureza, sino que también influye positivamente en la vida útil de la resina cromatográfica [35, 36]. Esto se debe a que existen otras etapas de purificación previas al paso de IEC y otros parámetros, como el tamaño del lote, que inciden en la pureza resultante.

5.2. Proceso de producción de antígeno de Hepatitis B – Proceso escalado

La escala del proceso base permitía que la carga, descarga y transferencia del producto del equipo de centrifugación se realizara con tanques o recipientes pequeños a través de mangueras de corta longitud. El proceso escalado, además del incremento en el tamaño del lote, implicó un nuevo diseño de ingeniería lo que significó el uso de tanques (dador y receptor) de gran capacidad, incremento del número de centrífugas, instalación de líneas de transferencia para transferir el producto entre los tanques y centrífugas y la automatización del proceso de elaboración por medio de un sistema de control central. Por lo tanto, el proceso escalado no solo se vio afectado por el cambio de escala sino también por las variables relacionadas con el cambio de la operación unitaria, es decir la presión ejercida por el producto dentro de los tanques, el tiempo de residencia y la velocidad de agitación dentro de éstos, el flujo requerido para distribuir el producto entre los equipos y la caída de presión en las líneas de transferencia, entre otros [37].

Al igual que en la sección anterior, se realiza una evaluación de los datos históricos del Proceso escalado para establecer la brecha existente con el Proceso base. Se evalúan los mismos parámetros:

- Valor de OD600nm de la etapa de Precipitación con PEG
- Valor de Pureza de la etapa de IEC

Los datos corresponden a los primeros catorce (14) lotes de la campaña obtenidos con el Proceso escalado los cuales se encuentran en el Anexo 2: Proceso escalado – valores de OD600nm y pureza de IEC.

A continuación, se muestran los resultados del análisis de datos y posteriormente se realiza la comparación entre ambos procesos.

- **Análisis de los resultados de densidad óptica:**

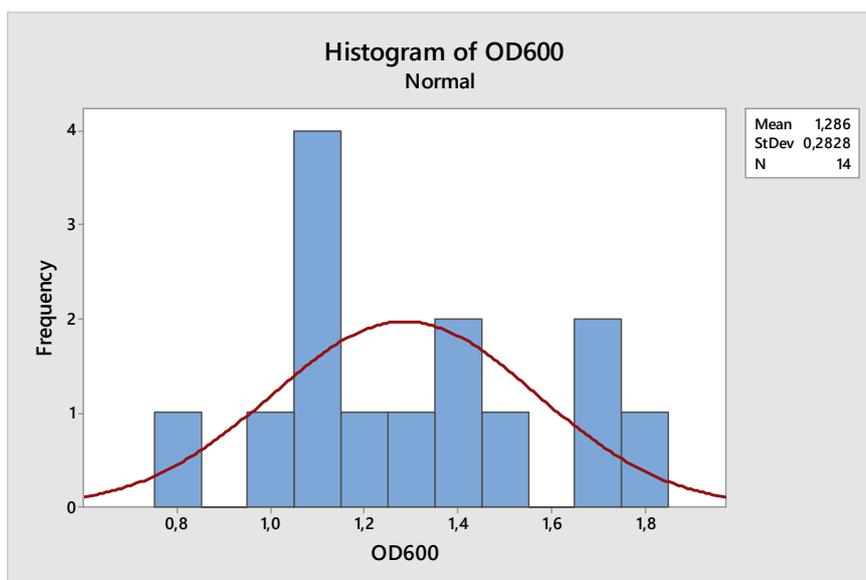


Figura 21 Histograma OD600nm – Proceso escalado

Tabla 11 Proceso escalado – Densidad óptica de referencia

OD600					
Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Escalado escalado	14	1,286	0,283	1,770	0,830

- **Análisis de los resultados de pureza:**

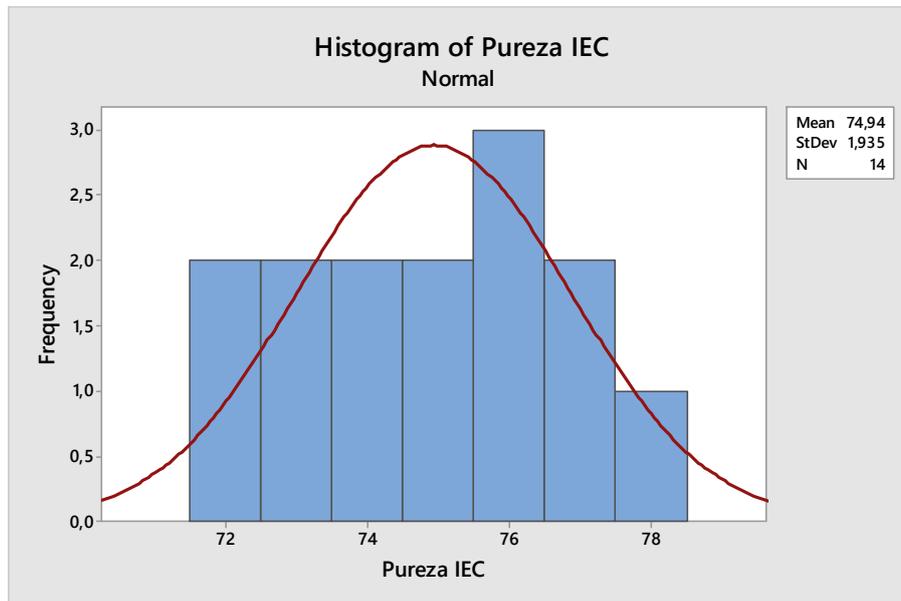


Figura 22 Histograma Pureza etapa de IEC (%) – Proceso base

Tabla 12 Proceso escalado – Pureza de IEC

Pureza de IEC					
Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Escalado	14	74,94	1,93	78,35	71,61

- **Análisis de la correlación entre OD600nm y pureza de IEC:**

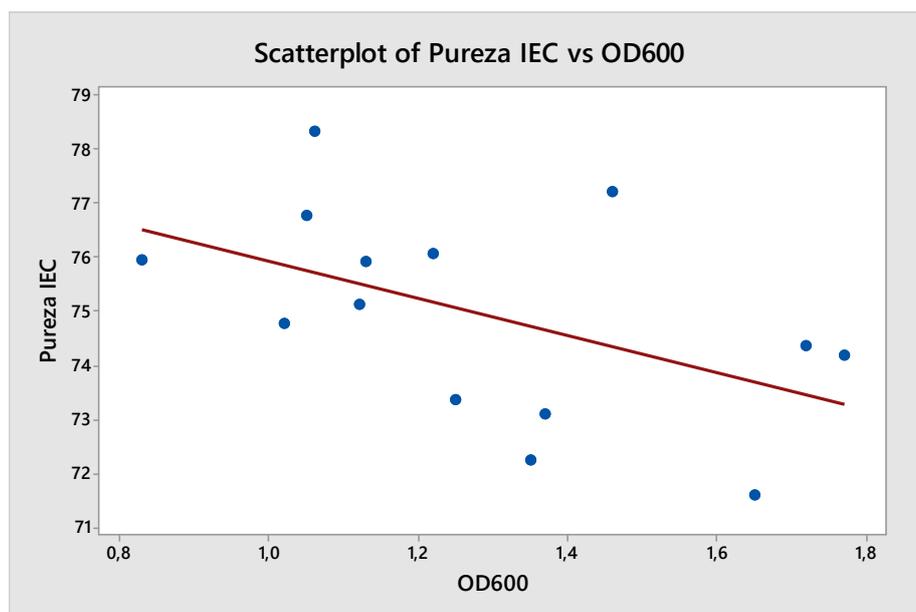


Figura 23 Relación entre OD600nm en etapa Precipitación con PEG y el porcentaje de Pureza en etapa de IEC

Tabla 13 OD600nm vs %Pureza – Análisis de regresión lineal

Regression Analysis: Pureza IEC versus OD600

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	12,31	12,312	4,06	0,067
OD600	1	12,31	12,312	4,06	0,067
Error	12	36,36	3,030		
Total	13	48,67			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,74069	25,30%	19,07%	2,47%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	79,36	2,24	35,37	0,000	
OD600	-3,44	1,71	-2,02	0,067	1,00

Regression Equation

$$\text{Pureza IEC} = 79,36 - 3,44 \text{ OD600}$$

Nota: el análisis de regresión lineal fue realizado utilizando el software Minitab®

5.3. Comparación Proceso Base vs Proceso Escalado

En la Tabla 14 se comparan los parámetros de proceso de la etapa Precipitación con PEG, y los valores resultantes de los controles de proceso del Proceso base versus el Proceso escalado.

- **Parámetros de Proceso**

Tabla 14 Parámetros de proceso – Base vs Escalado

Parámetro	Proceso Base (Valor)	Proceso Escalado (Valor)
Velocidad	10.500 rpm	10.500 rpm
Flujo de alimentación	0,5 kg/min	0,5 kg/min
Nº scrape	3	3
Nº de centrifugas	1	3
Nº ciclos de centrifugación	2	3
Nº total de ciclos de centrifugación	2	9
Masa procesada por ciclo	Ciclo 1: 40 kg Ciclo 2: 60 kg	Ciclo 1 y 2: 50 kg Ciclo 3: 60 kg

Los parámetros de centrifugación, velocidad, flujo de alimentación y cantidad de raspados (scrapes) se mantuvieron constantes entre ambos procesos, a diferencia del número total de ciclos de centrifugación y la masa procesada por ciclo que fueron modificados debido al cambio de escala [38].

- **Controles de Proceso**

Tabla 15 Controles de Proceso – Base vs Escalado

Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
OD600					
Base	130	0,499	0,132	0,840	0,330
Escalado	14	1,286	0,283	1,770	0,830
Pureza de IEC					
Base	130	78,56	2,10	85,03	70,06
Escalado	14	74,94	1,93	78,35	71,61

Al comparar los datos del Proceso escalado con respecto a los del del Proceso base se observó que hay un aumento significativo en el valor promedio de OD600nm (0,499 vs 1,286) y un decrecimiento del valor de la pureza en la etapa de IEC (78,56 vs 74,94) (Tabla 15).

Las diferencias observadas también pueden evidenciarse al analizar los datos individuales (Figura 24).

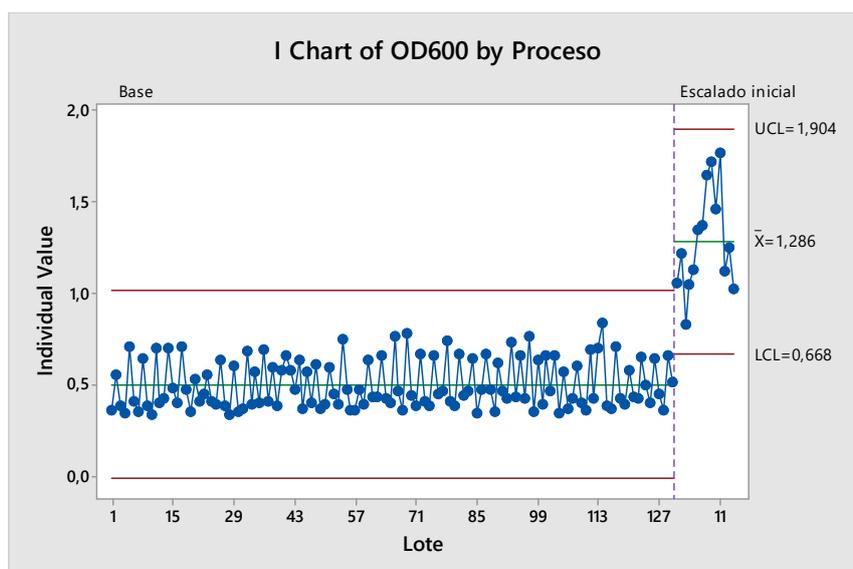


Figura 24 Datos individuales de OD600nm segmentados por escala

El mismo tratamiento de datos se realizó con los resultados de las purezas de la etapa de IEC (Figura 25).

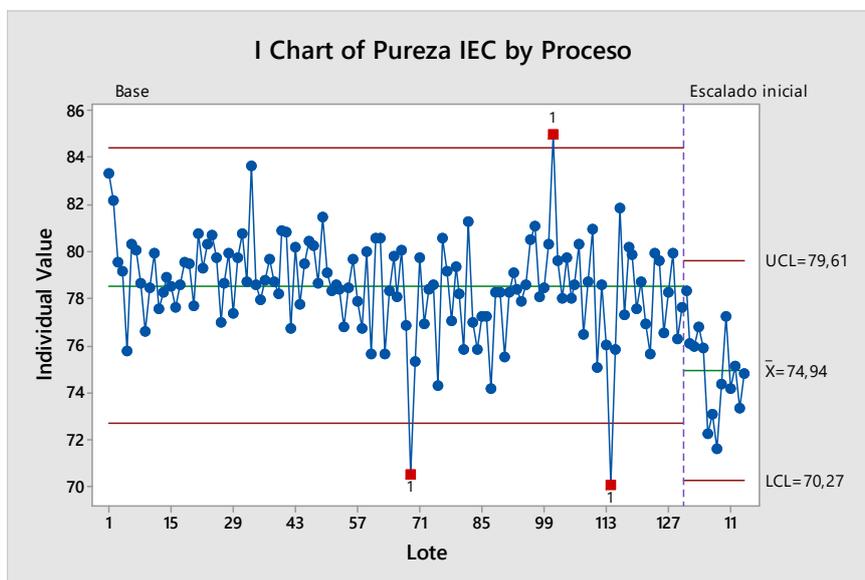


Figura 25 Datos individuales de Pureza segmentados por escala

En las cartas de control se puede apreciar un comportamiento diferente entre los Procesos base y escalado. Mientras que el promedio de OD600nm del Proceso base es 0,499 u.a. y los límites de control entre 1,012 y -0,014, para el Proceso escalado es de 1,286 u.a. y sus límites de control 1,904 y 0,668 (Figura 24). Puede verificarse que el promedio del Proceso escalado no está contenido dentro de los límites de control del Proceso base.

En el caso de la pureza, el Proceso base tiene un promedio de 78,56% y los límites de control son 84,41 y 72,70, y en el proceso escalado el promedio es 74,94% y los límites de control 79,61 y 70,27 (Figura 25). El valor promedio de pureza del Proceso escalado se encuentra entre el promedio y el límite de control inferior del Proceso base. Esto puede deberse a la eficiencia de los pasos de purificación posteriores a la Precipitación con PEG.

5.4. Ensayos para la optimización de la etapa de Precipitación con PEG

De la comparación realizada entre el Proceso base y escalado quedan evidenciadas las diferencias entre ambas escalas. Si bien el proceso escalado se diseñó a partir del base, la diferencia de escala, los cambios de automatización y algunas operaciones como la

transferencia de producto, pueden influir en las diferencias observadas. Es por esto por lo que los valores del proceso base se toman como referencia para las mejoras ensayadas.

5.4.1. Mejora en la eliminación de sólidos remanentes: experimento 1

Primeramente, se realizó una comparación visual del estado del recipiente de centrifugación luego de cada una de las pruebas realizadas, es decir luego de:

- i) La disminución de la distancia entre los dientes de raspado y la pared del recipiente de centrifugación (Figura 27).
- ii) La ejecución de un raspado húmedo, es decir realizando una inyección de agua a través de los dientes del brazo mientras se realiza el raspado (Figura 28), y
- iii) La limpieza completa del recipiente de centrifugación entre ciclos (Figura 29).

A continuación, se muestran las fotografías obtenidas de cada prueba.

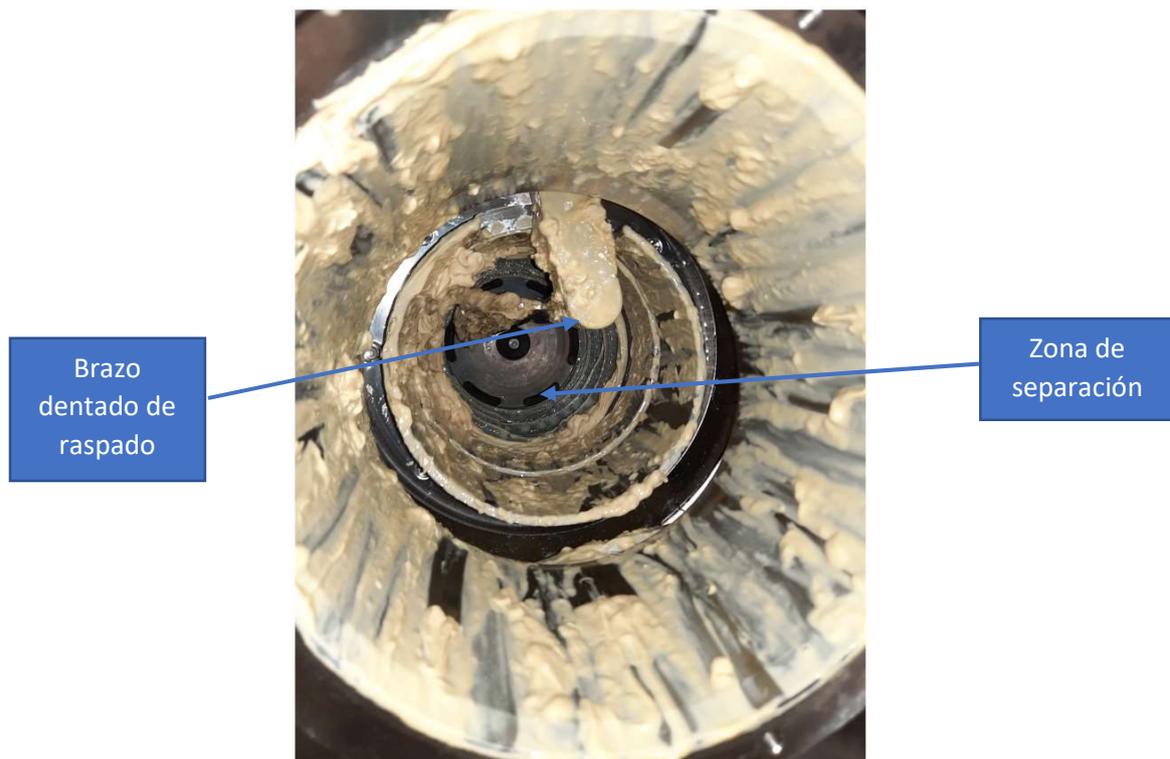


Figura 26 Interior del recipiente luego de finalizado el proceso de centrifugación (antes del raspado)



Figura 27 Interior del recipiente luego del proceso de raspado (scrape)



Figura 28 Interior del recipiente luego del proceso de raspado húmedo (scrape)



Figura 29 Interior del recipiente luego de una limpieza completa

Visualmente se comprueba que se obtienen mejores resultados, es decir mejor remoción de sólidos, 1° luego de ejecutar la limpieza completa del equipo entre ciclos (Figura 29), 2° con el scrape húmedo (Figura 28) y 3° con el scrape seco (Figura 27).

El tiempo requerido para cada una de las pruebas ejecutadas en inversamente proporcional al resultado obtenido. Si bien el mejor resultado se obtuvo con la limpieza completa de equipo entre ciclos, esto significó aumentar el tiempo de proceso en cuatro (4) horas aproximadamente, mientras que la prueba de scrape seco requirió solamente de 15 minutos. Entonces, considerando los tiempos operativos y con el objetivo de no extenderlos, se decidió comenzar implementando un procedimiento para regular y controlar lote a lote la distancia entre los dientes del brazo dentado y la pared del recipiente al menor valor del rango permitido.

Con esta configuración se elaboraron siete (7) lotes de los cuales se analizan los datos a continuación.

Tabla 16 OD600nm y %Pureza – Scrape Ajustado

OD600 (abs)	Pureza IEC (%)
0,87	74,8
0,89	74,3
1,01	75,6
0,91	72,9
1,10	77,8
0,93	78,0
1,03	78,6

- **OD600nm – Raspado (scrape) ajustado**

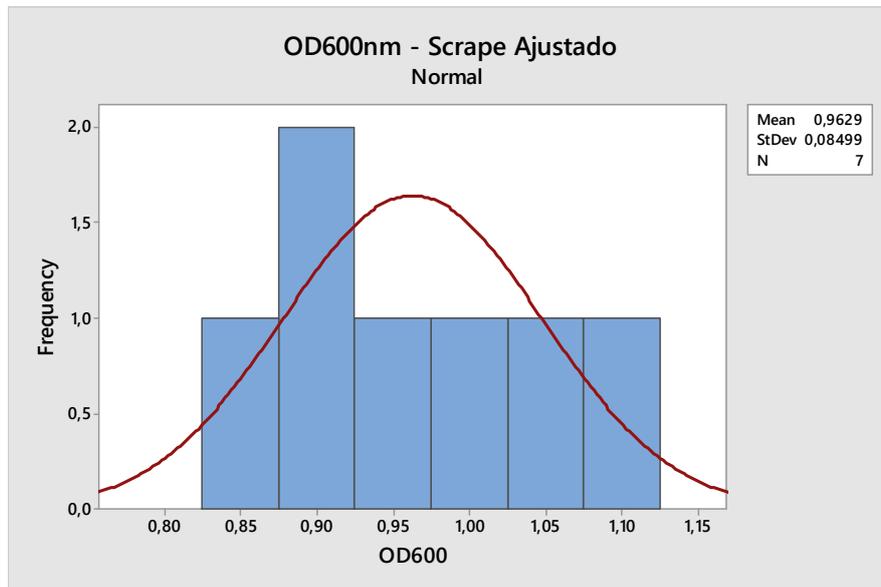


Figura 30 Distribución (Histograma) – OD600 del sobrenadante de centrifugación

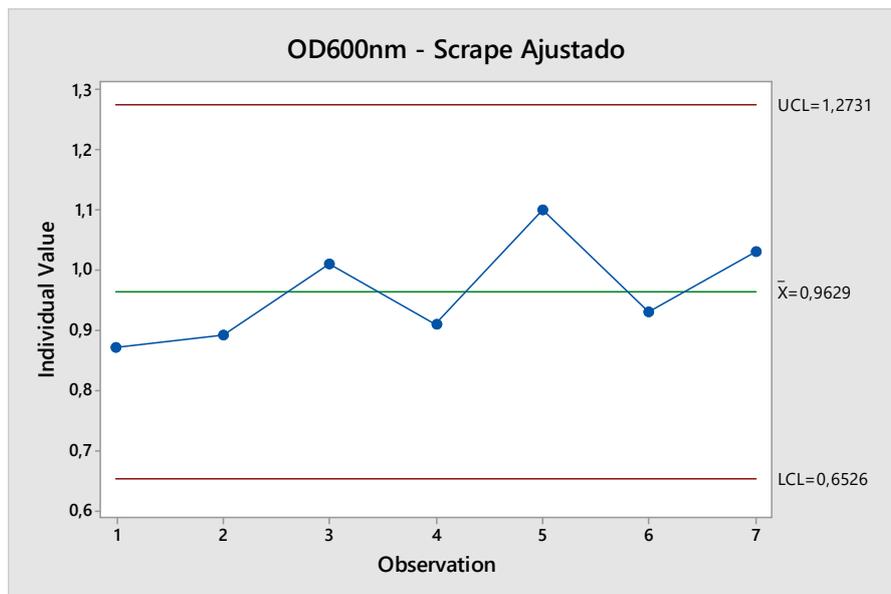


Figura 31 OD600 Scrape Ajustado – Datos individuales

- **Pureza de IEC – Raspado (scrape) ajustado**

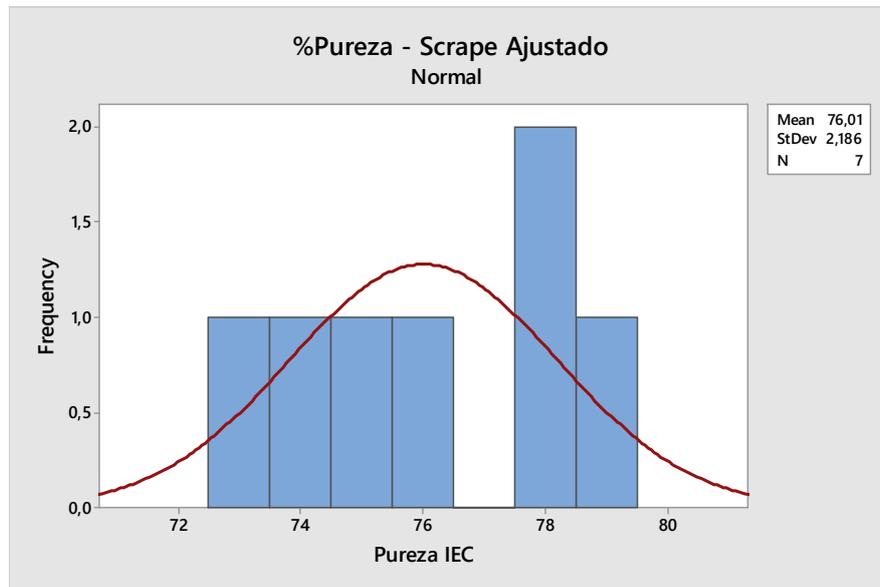


Figura 32 Distribución (Histograma) – Pureza (SDS-Page) Etapa IEC

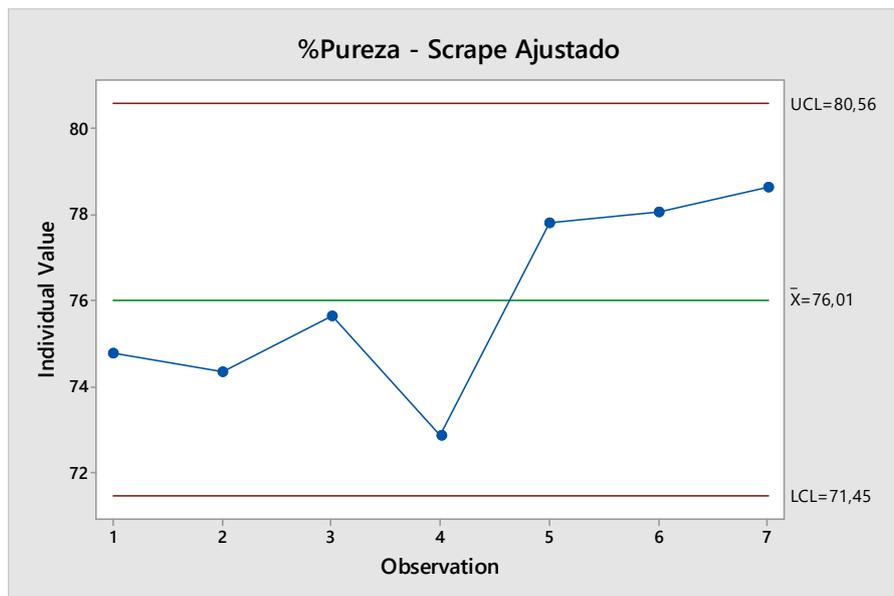


Figura 33 %Pureza Scrape Ajustado – Datos individuales

En la Tabla 17 se recopilan los resultados del ensayo y se comparan con los del Proceso base y escalado:

Tabla 17 Comparación resultados Experimento 1, Escalado y Proceso Base

Proceso	Escalado Scrape Ajustado		Escalado		Base	
	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control
OD600 nm (u.a)	0,9629	1,2731 – 0,6526	1,286	1,904 – 0,668	0,499	1,012 – (-0,014)
Pureza en IEC (%)	76,01	80,56 – 71,45	74,94	79,61 – 70,27	78,56	84,41 - 72,70

Los resultados muestran una reducción significativa del valor promedio de OD600nm con el scrape ajustado respecto del resultado sin ajuste (0,9629 vs 1,286). Además, cuando se compara con el Proceso base, el valor promedio de OD600nm luego del ajuste (0,9629) se encuentra dentro de los límites de control del proceso de referencia (1,012 – (-0,014)) (Tabla 17).

De acuerdo con los valores obtenidos se comprueba que el ajuste de la distancia de los dientes del brazo dentado logra mejorar la remoción de sólidos luego de cada ciclo de centrifugación, lo que implica una menor transferencia de sólidos de un ciclo al otro y por lo tanto una mejora de la eficiencia general.

Al evaluar el porcentaje de pureza, el promedio obtenido fue de 76,01% mientras que el previo al ajuste fue de 74,94%.

Cabe aclarar que, debido a las mejoras observadas en esta prueba, las condiciones de scrape ajustado fueron incorporadas de forma permanente al proceso de centrifugación.

5.4.2. Experimento 2: Modificación de flujo de alimentación

Para este ensayo se redujo el flujo de alimentación de 0,50 kg/min a 0,45 kg/min. Este cambio se realizó modificando la receta del sistema de control que comanda el proceso y que transcurre en forma totalmente automatizada. La prueba involucró ocho (8) lotes utilizando la misma escala de proceso comercial.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 18 OD600nm y %Pureza – Modificación de flujo de alimentación

OD600 (abs)	Pureza IEC (%)
0,91	77,8
1,02	80,6
0,79	77,7
0,84	76,4
1,13	76,7
0,91	78,1
0,93	76,3
0,80	76,3

- OD600nm – Modificación flujo alimentación

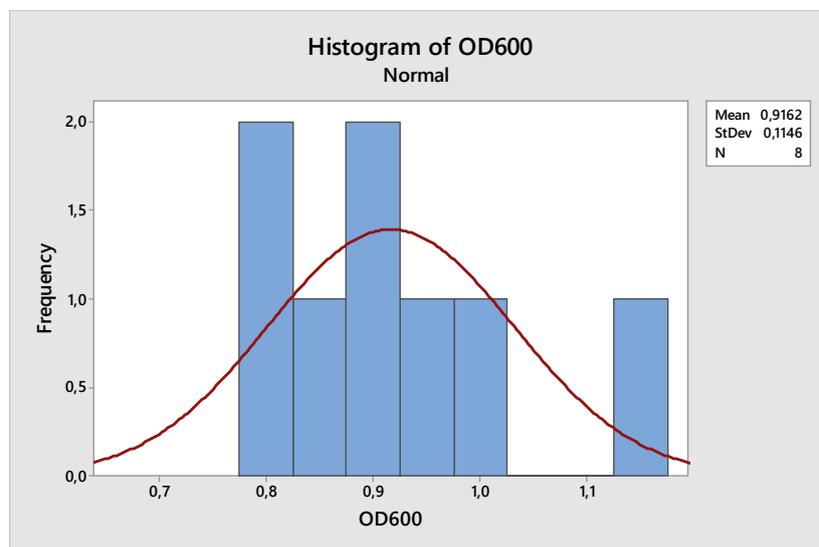


Figura 34 Distribución (Histograma) – OD600 del sobrenadante de centrifugación

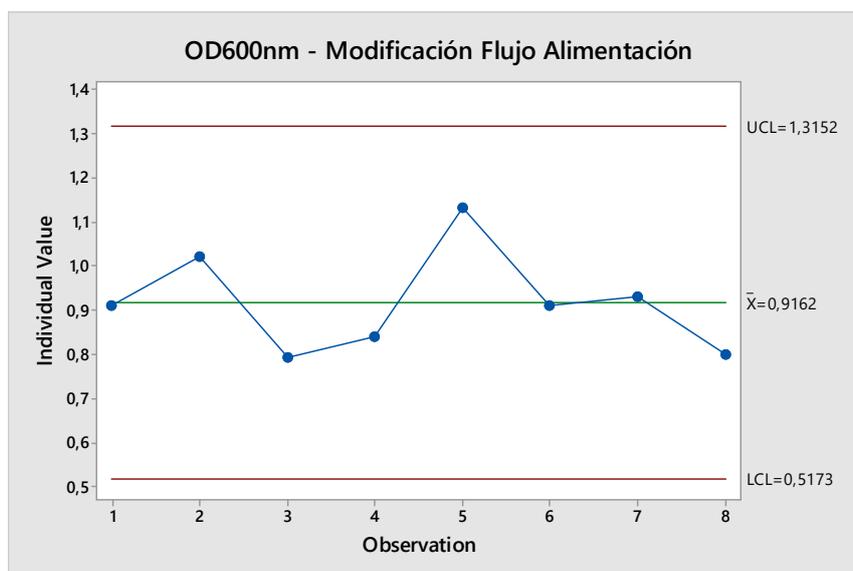


Figura 35 OD600 Modificación Flujo Alimentación – Datos individuales

- **%Pureza de IEC – Modificación flujo alimentación**

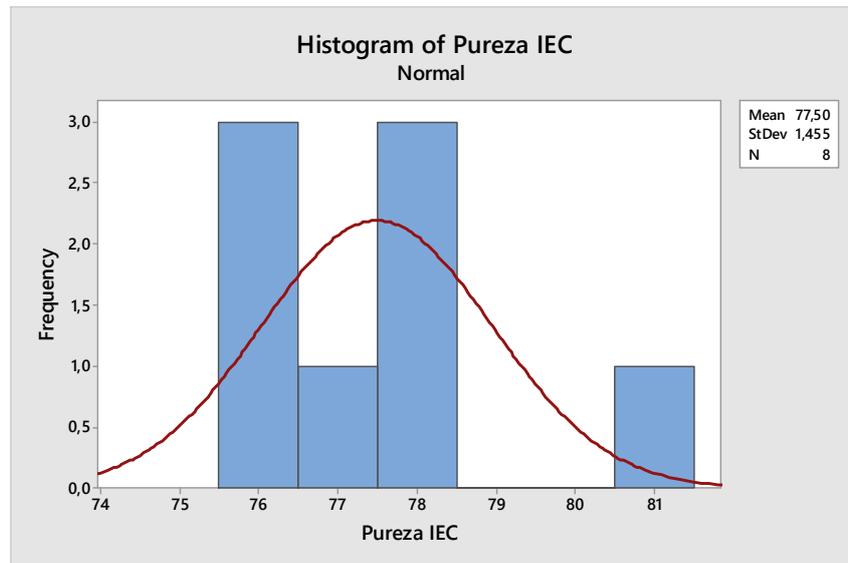


Figura 36 Distribución (Histograma) – Pureza (SDS-Page) Etapa IEC

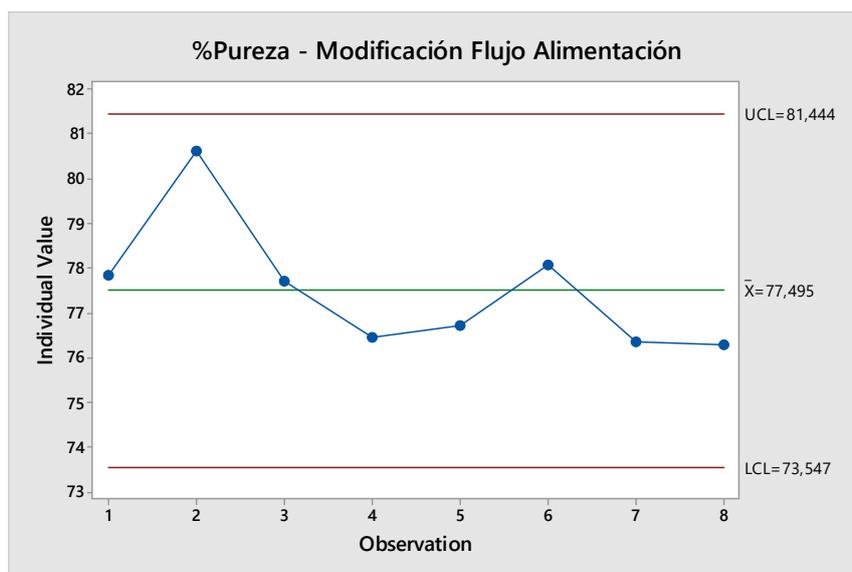


Figura 37 %Pureza Modificación Flujo Alimentación – Datos individuales

En la Tabla 19 se recopilan los resultados del ensayo y se comparan con los del Proceso base y escalado:

Tabla 19 Comparación resultados Experimento 2, Escalado y Proceso Base

Proceso	Escalado Modificación Flujo de Alimentación		Escalado Inicial		Base	
	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control
OD600 nm (u.a)	0,9162	1,3152 – 0,5173	1,286	1,904 – 0,668	0,499	1,012 – (-0,014)
Pureza en IEC (%)	77,495	81,444 – 73,547	74,94	79,61 – 70,27	78,56	84,41 - 72,70

Esta prueba significó una mejora respecto al Proceso Escalado del valor de OD600nm (0,9162 vs 1,286) y del porcentaje de pureza (77,495 vs 74,94).

Al comparar estos resultados con los del scrape ajustado, también se observa una mejora, aunque menos significativa que cuando la comparación se realiza con el proceso antes del ajuste.

Tabla 20 Comparación resultados Experimento 1 y Experimento 2

Proceso	Escalado Modificación Flujo de Alimentación		Escalado Scrape Ajustado	
	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control
OD600 nm (u.a)	0,9162	1,3152 – 0,5173	0,9629	1,2731 – 0,6526
Pureza en IEC (%)	77,495	81,444 – 73,547	76,01	80,56 – 71,45

5.4.3. Experimento 3: Modificación de la carga en el recipiente de centrifugación

5.4.3.1. Carga de producto por ciclo de centrifuga

De acuerdo con lo detallado en 4.5.3.1 Evaluación de la carga en cada ciclo de centrifugación, en la Figura 38 se muestra la cantidad de producto procesado en cada ciclo de centrifugación en la etapa precipitación con PEG entre el Proceso sin escalar (Proceso base) y el Proceso escalado.

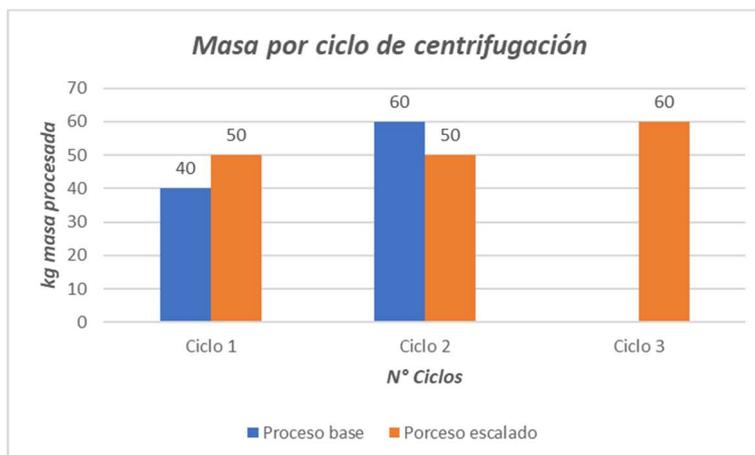


Figura 38 Comparación de masa por ciclo de centrifugación

Los datos analizados apoyaron la hipótesis de una sobrecarga de producto en el recipiente de centrifugación en el Proceso escalado ya que al comparar el ciclo 1 y 2 de cada proceso, en el Proceso escalado hay 10 Kg más de producto respecto al Proceso base lo que podría resultar en una acumulación de sólidos entre ciclos, provocando un aumento del valor de OD600nm al final de la etapa debido a la sobrecarga del recipiente de la centrífuga.

Por otro lado, tal cual se describió en 4.5.3, se realizaron mediciones off-line de OD600nm del sobrenadante de PEG y on-line por medio del agregado de un turbidímetro a la salida de una de las centrífugas.

En la misma sección, la Figura 15 representa los puntos seleccionados para realizar las mediciones correspondientes. Los resultados de los nueve (9) lotes involucrados se muestran a continuación.

Tabla 21 OD600nm off line – Modificación Carga Recipiente

Punto	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Promedio	RSD	RSD%
Principio	0,594	0,514	0,860	0,646	0,630	0,623	0,438	0,526	0,461	0,588	0,127	22
Medio	0,709	0,644	0,718	0,614	0,890	0,643	0,535	0,674	0,759	0,687	0,100	15
Final	0,929	0,910	1,020	0,790	1,130	0,840	0,900	0,930	0,800	0,917	0,107	12

La Figura 39 muestra la variación del promedio de OD600 de los nueve lotes estudiados.

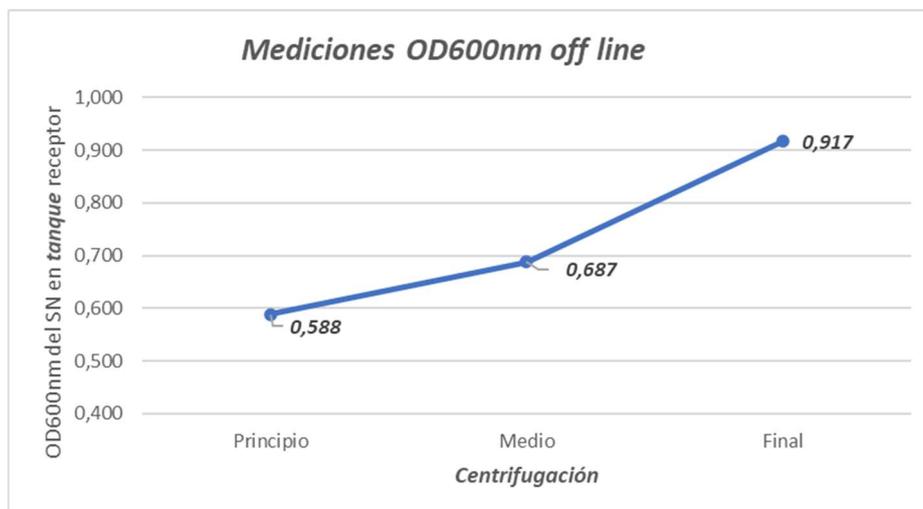


Figura 39 OD600nm (off line) – Modificación Carga Recipiente

Se observa un incremento del valor de OD600nm del sobrenadante a medida que avanza el proceso de centrifugación.

En paralelo con las mediciones off-line, se realizaron las mediciones on-line con el turbidímetro. Este instrumento colecta datos de OD600nm cada 5 segundos los cuales son almacenados en el software del instrumento. Estos datos luego son exportados a Excel® para su análisis. A continuación, se presenta el análisis de uno de los lotes involucrados en la medición, así como también la interpretación del gráfico obtenido (Figura 40).

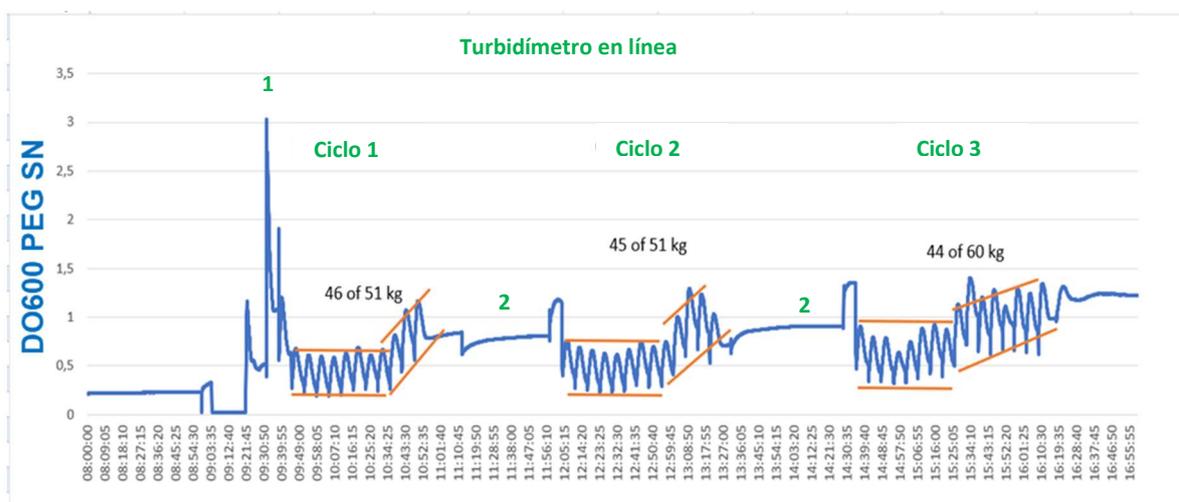


Figura 40 OD600nm (turbidímetro) – Modificación Carga Recipiente

Descripción del gráfico:

Punto **1**: corresponde a la primera descarga de la centrifuga. Dado que la cañería (línea de transferencia) que recibe el sobrenadante se encuentra vacía, la primera descarga de líquido produce una perturbación en el instrumento provocando un aumento significativo del valor de OD600nm (aproximadamente 3).

Punto **2**: corresponde a las etapas entre ciclos de centrifugación. En esta fase, el sobrenadante contenido en la línea de transferencia se encuentra estático (no hay circulación) por lo tanto la lectura se mantiene constante.

Puntos **Ciclos 1, 2 y 3**: corresponde a la medición de OD600nm durante el proceso de centrifugación. La lectura de OD600nm presenta máximos y mínimos (forma ondulatoria) porque la descarga del sobrenadante ocurre en forma pulsátil.

Los equipos de la línea de producción se encuentran conectados a un sistema de control central que colecta información en forma continua. Con ayuda de este sistema se puede hacer un cruce de datos entre este sistema y los valores de OD600nm colectados por el turbidímetro en línea y establecer la relación entre OD600nm y masa de producto procesada.

La Figura 41 muestra la información de caudal y de producto procesada obtenida del sistema de control.

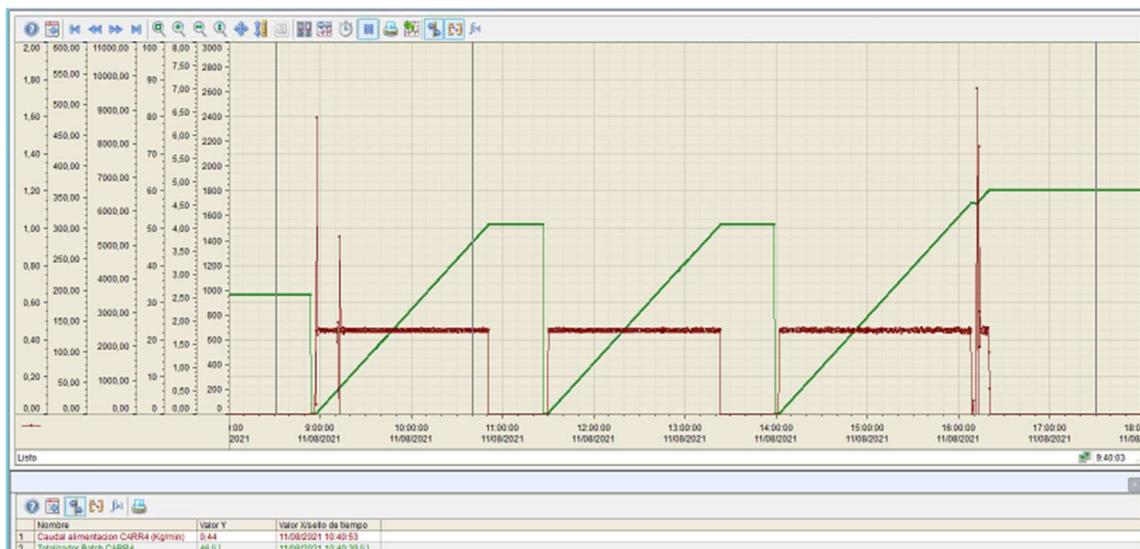


Figura 41 Caudal y Peso de Producto (sistema de control) – Modificación Carga Recipiente

Del cruce de datos de ambos sistemas se pudo determinar que el valor de OD600nm se mantiene constante durante los primeros 45 kg de producto procesados y luego de éste se evidencia un incremento de este parámetro.



Esta observación, como la obtenida con la medición off-line, están alineadas con la hipótesis planteada de sobrecarga del recipiente de centrifugación.

Ante este hallazgo, se planteó reducir la carga de producto en los primeros ciclos de centrifugación, adicionando un ciclo más de centrifugación.

5.4.3.2. Centrifugación: 9 ciclos vs 12 ciclos

Habiendo confirmado la hipótesis planteada se incrementó en uno los ciclos de centrifugación en cada equipo, por lo tanto, la cantidad de producto centrifugado se dividió en doce (12) ciclos totales en lugar de nueve (9).

El experimento se llevó a cabo en 4 lotes de la escala industrial obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 22 OD600nm – 12 Ciclos de Centrifugación

OD600 (abs)	Pureza IEC (%)
0,87	80,2
0,87	75,8
0,75	79,4
0,69	80,5

- *OD600nm – 9 ciclos vs 12 ciclos*

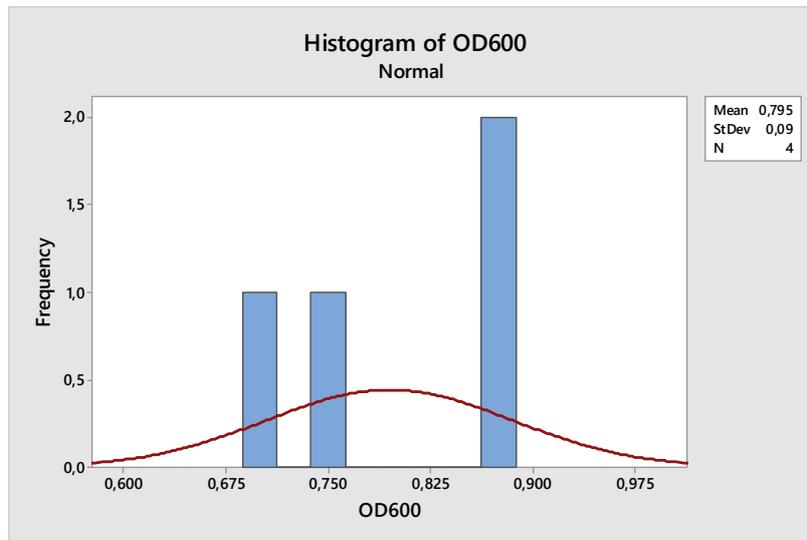


Figura 42 Distribución (Histograma) OD600nm – 12 ciclos de centrifugación

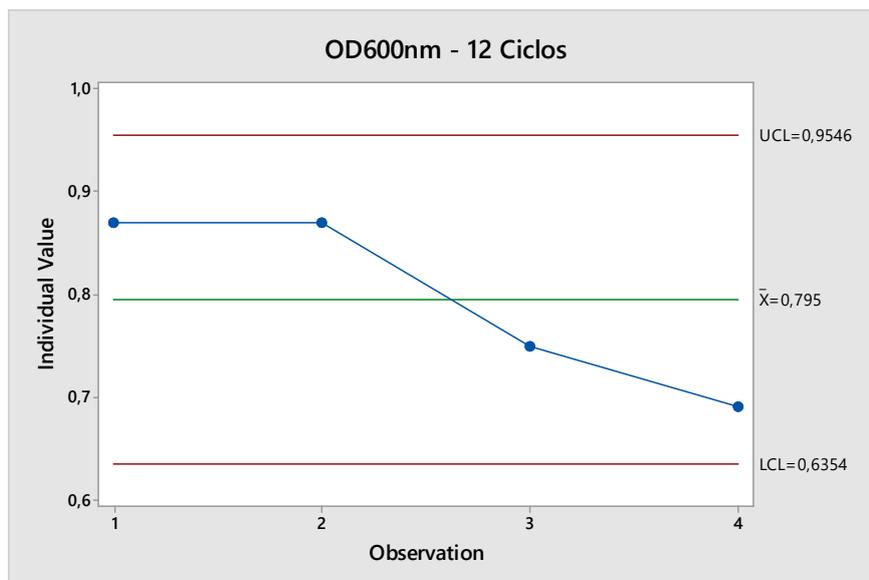


Figura 43 OD600nm 12 Ciclos – Datos individuales

- *%Pureza de IEC – 9 ciclos vs 12 ciclos*

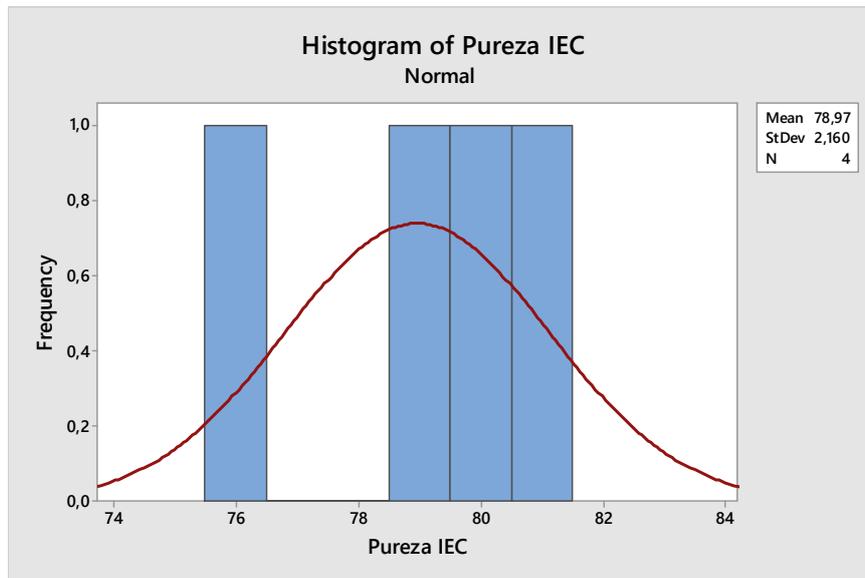


Figura 44 Distribución (Histograma) %Pureza – 12 ciclos de centrifugación

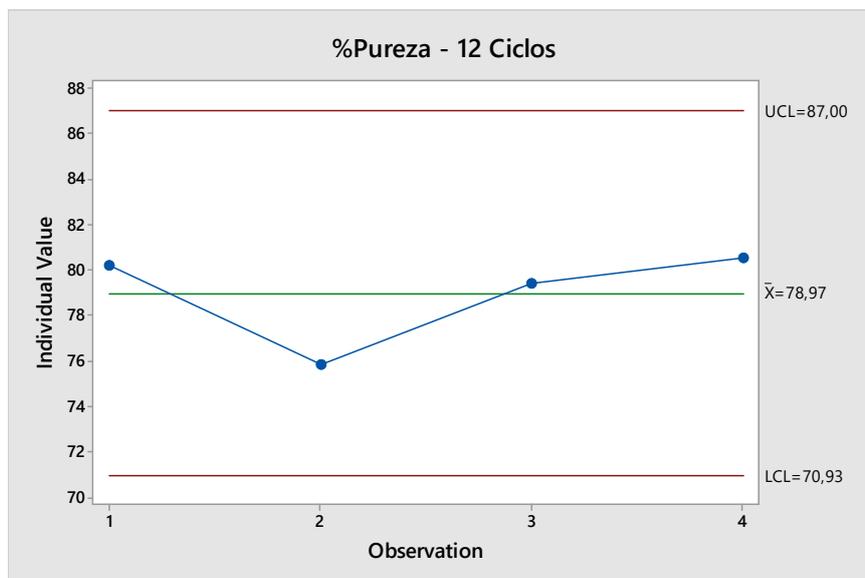


Figura 45 %Pureza 12 Ciclos – Datos individuales

En la Tabla 23 se recopilan los resultados del ensayo y se comparan con los del Proceso base y escalado y en la Tabla 24 se comparan contra el proceso con el scrape ajustado:

Tabla 23 Comparación de resultados, escalado y proceso base: experimento 3

Proceso	Escalado Modificación Carga de Recipiente		Escalado		Base	
	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control
OD600 nm (u.a)	0,795	0,9546 – 0,6354	1,286	1,904 – 0,668	0,499	1,012 – (-0,014)
Pureza en IEC (%)	78,97	87,00 – 70,93	74,94	79,61 – 70,27	78,56	84,41 - 72,70

Tabla 24 Comparación resultados Experimento 1 y Experimento 3

Proceso	Escalado Modificación Carga de Recipiente		Escalado Scrape Ajustado	
	Promedio	Límites de Control	Promedio	Límites de Control
OD600 nm (u.a)	0,795	0,9546 – 0,6354	0,9629	1,2731 – 0,6526
Pureza en IEC (%)	78,97	87,00 – 70,93	76,01	80,56 – 71,45

El valor de OD600nm (0,795) y el de pureza (78,97) demostró que esta prueba mejoró la eficiencia del proceso de centrifugación cuando se compara con el Proceso Escalado (1,286 y 74,94) y el proceso con el scrape ajustado (0,9629 y 76,01) respectivamente.

5.5. Análisis integral de los experimentos

5.5.1. OD600nm

Luego de la evaluación realizada de cada uno de los experimentos llevados a cabo, en esta sección se comparan en conjunto todos los resultados obtenidos con el fin de analizar el aporte de cada uno de ellos en la optimización lograda en el paso de centrifugación de la etapa Precipitación con PEG.

La Tabla 25 muestra el número de lotes involucrados en cada experimento, el promedio, desvío estándar, máximo y mínimo del valor de OD600nm del sobrenadante de PEG.

Tabla 25 OD600nm – Comparación entre todos los experimentos

OD600

Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Base	130	0,499	0,132	0,840	0,330
Escalado	14	1,286	0,283	1,770	0,830
Escalado scrape regulado	7	0,963	0,085	1,100	0,870
Proceso escalado Flujo 0,45	8	0,916	0,115	1,130	0,790
Proceso escalado 12 ciclos	4	0,795	0,090	0,870	0,690

- Base: estos valores corresponden al proceso que se toma como referencia puesto que son previos al escalado.
- Escalado: valores de los primeros lotes del proceso en la nueva escala antes de implementar las pruebas de optimización.
- Escalado scrape regulado: valores obtenidos luego de implementar el ajuste del brazo dentado responsable de la remoción de sólidos entre ciclos de centrifugación. Este procedimiento fue implementado antes de iniciar cada lote de producto y consiste en la medición y ajuste de esta pieza del equipo. Esta tarea fue incluida en la rutina de mantenimiento y ajuste del equipo. Dado que este procedimiento fue implementado de forma definitiva, los experimentos siguientes incluyen esta mejora.
- Proceso escalado flujo 0,45: valores obtenidos en los lotes donde se redujo el flujo de alimentación un 10% respecto al Proceso base y el escalado.
- Proceso escalado 12 ciclos: valores obtenidos en los lotes en donde se incrementó el número de ciclos de centrifugación con el objetivo de modificar la carga en el recipiente de centrifugación.

El orden en que se presenta los resultados es cronológico respecto a la realización de cada uno de los experimentos.

En los gráficos siguientes se observa el promedio y los límites de control estadístico de cada experimento del valor de OD600nm. En el primero de ellos se muestran los valores individuales y en el segundo los promedios.

- **OD600nm – Valores individuales**

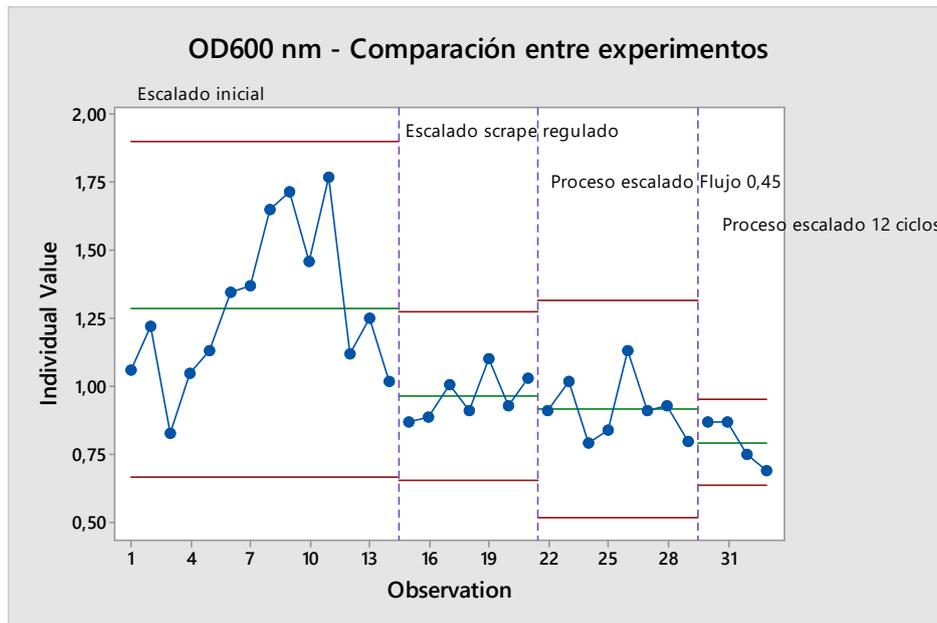


Figura 46 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos individuales

- **OD600nm – Valores promedios**

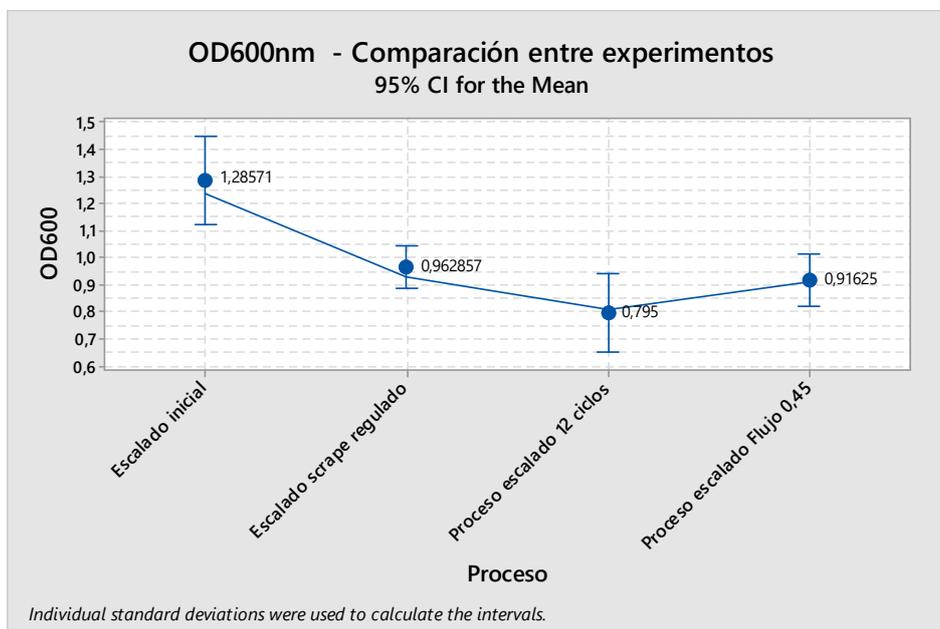


Figura 47 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos promedio

Desde el punto de vista del valor de OD600nm y siendo este un indicador de la eficiencia del proceso de centrifugación, se puede verificar que la implementación del procedimiento de regulado del scrape produjo una mejora respecto al Proceso escalado

(0,963 vs 1,286). Luego, al comparar los experimentos de modificación de la carga del recipiente (12 ciclos) y la modificación del flujo de alimentación (reducción del 10%, de 0,50 a 0,45 kg/min) se observa que el experimento de los 12 ciclos logra una mayor reducción del valor de OD600nm (0,795), pero el de reducción de flujo resulta ser más estable pues el rango de los límites de control estadístico es menor (Figura 47).

5.5.2. Pureza de IEC

Se realiza el mismo análisis que en el punto anterior, en este caso sobre el resultado de pureza de IEC.

Tabla 26 OD600nm – Comparación entre todos los experimentos

Pureza de IEC

Proceso	N	Media	Desvío Std	Máximo	Mínimo
Base	130	78,56	2,10	85,03	70,06
Escalado	14	74,94	1,93	78,35	71,61
Escalado scrape regulado	7	76,01	2,19	78,63	72,86
Proceso escalado 12 ciclos	4	78,97	2,16	80,50	75,80
Proceso escalado Flujo 0,45	8	77,50	1,46	80,61	76,27

- Pureza de IEC – Valores individuales**

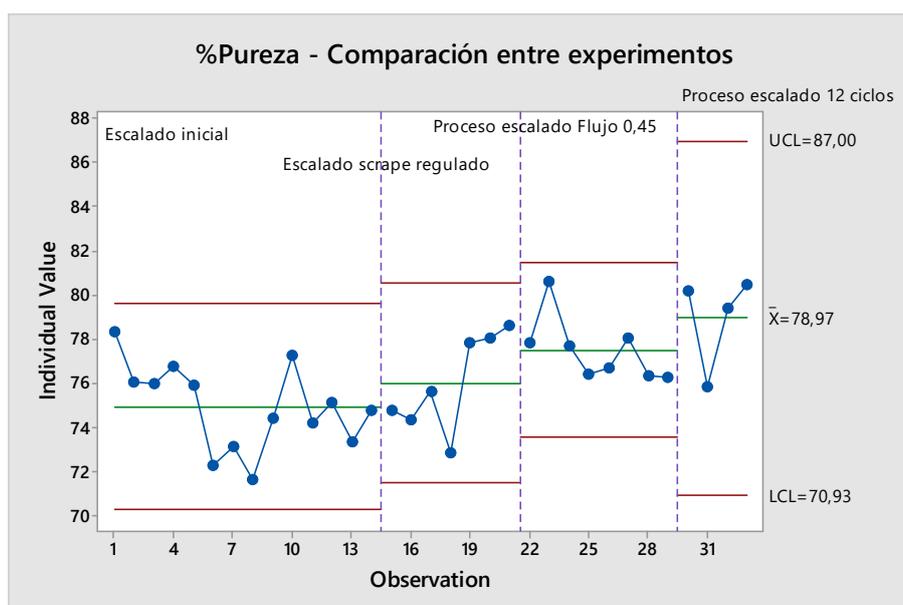


Figura 48 %Pureza Comparación entre experimentos – Datos promedio

- Pureza de IEC – Valores promedio

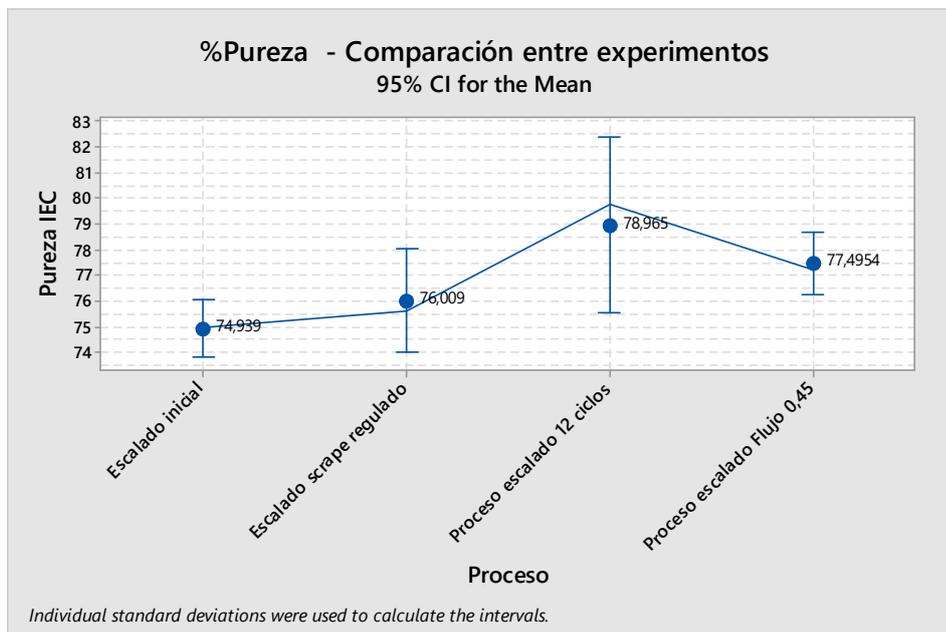


Figura 49 OD600nm Comparación entre experimentos – Datos promedios

Al igual que en el análisis anterior, se observa que los resultados con mayor porcentaje de pureza, se obtuvieron con el experimento de los 12 ciclos de centrifugación (78,97) pero con el experimento de flujo 0,45 kg/min los resultados fueron más estables.

Estos datos están alineados con el postulado de que una mejora de la etapa de centrifugación produce un aumento del porcentaje de pureza en la etapa de IEC. Este comportamiento puede visualizarse en el siguiente gráfico (Figura 49).

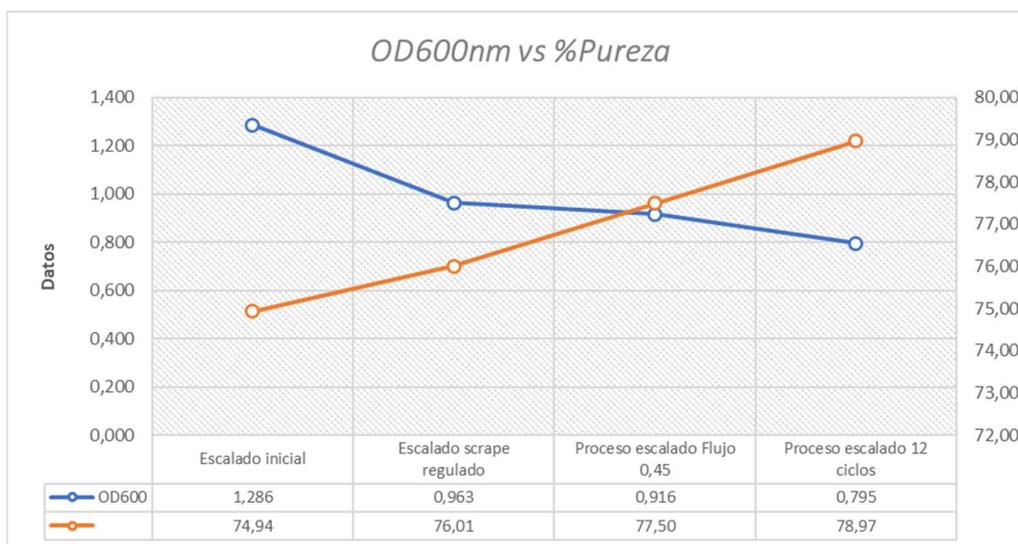


Figura 50 OD600nm vs %Pureza

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de pureza en la etapa de IEC, este hecho no solo respalda la experiencia práctica de que para lograr mejores resultados de pureza se requieren menores valores de OD600nm en la etapa de Precipitación con PEG, sino que desde el punto de vista del proceso, valores de pureza menores a 75.0% significan un incumplimiento de límites de proceso internos requiriéndose tomar acciones de corrección. Dado que todos los experimentos condujeron a resultados de pureza promedio por encima de este límite interno, se considera que las mejoras observadas son significativas desde la perspectiva del proceso de elaboración.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue la optimización de la etapa de centrifugación del proceso de purificación del Antígeno del virus de la Hepatitis B de la vacuna pediátrica hexavalente para lo cual se plantearon tres experimentos diferentes. De acuerdo con los resultados obtenidos en dichos experimentos se puede concluir lo siguiente:

- i) La implementación de un procedimiento para controlar y ajustar la distancia del brazo dentado respecto a la pared del recipiente de centrifugación produjo una reducción del valor de OD600nm del sobrenadante de la etapa de Precipitación con PEG (experimento 1).
- ii) La disminución del caudal de alimentación de la centrífuga que conlleva a un aumento de residencia permitió disminuir valor de OD600nm del sobrenadante de la etapa de Precipitación con PEG (experimento 2).
- iii) El aumento del número de ciclos de centrifugación, y por ende una reducción de la carga de producto en cada ciclo, resultó en una disminución del valor de OD600nm del sobrenadante de la etapa de Precipitación con PEG (experimento 3).
- iv) En todos los casos en que se logró disminuir el valor de OD600nm, se observó un incremento del %Pureza en la etapa de IEC. Si bien las diferencias observadas no son estadísticamente significativas, la experiencia sobre el proceso indica que valores por encima del 75% de pureza conducen a un proceso más estable y controlado y, además, resulta más beneficioso para la vida útil de la resina cromatográfica.

Por último, cabe destacar que el procedimiento de ajuste de raspado (scrape) (experimento 1) fue incorporado al plan de mantenimiento de equipos de modo de asegurar la correcta remoción de sólidos entre ciclos de centrifugación. Por otro lado, los experimentos 2 y 3 brindaron información empírica permitiendo conocer cómo se comporta el proceso de elaboración frente a cambios en los parámetros de proceso y como posibles mejoras a implementar en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- [1] Kiely PDW (2016). Biologic efficacy optimization—a step towards personalized medicine Rheumatology. 2016;55 (5):780-8.
- [2] A. Prieto Martínez, J. Barbarroja Escudero, S. Haro Girón y A. Pérez Gómez (2021): Avances y perspectivas actuales en recursos y estrategias terapéuticas: fármacos biológicos. Medicine. 2021;13(33):1882-92.
- [3] van den Bemt B, Gettings L, Domanska B, Brugger R, Mountian I, Kristensen LE. A portfolio of biologic self-injection devices in rheumatology: how patient involvement in device design can improve treatment experience. Drug Delivery. 2019;26(1):384-92.
- [4] <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/biosimilar-medicines-overview>
- [5] <https://www.caeme.org.ar/el-impacto-de-la-biotecnologia-en-la-produccion-de-medicamentos/>
- [6] <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Biological-Product-Definitions.pdf>
- [7] P.Akhil Susmith, Soha Sanobar, Vadluri Prathyusha, Bhavya Sri, Kabya Pratap (2021): A review on vaccines - benefits and risks. J. innov.appl. pharm. Sci, 6(3) 2021, 43-47
- [8] <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
- [9] Jeonghwan Kim, Yulia Eygeris, Mohit Gupta, Gaurav Sahay (2021). Self-assembled mRNA vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews 170 (2021) 83–112. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.014>
- [10] Afifa Ansari, Ayush Madan, Divya Prakash (2021): VACCINE DEVELOPMENT-A COMPLEX SCIENCE. EPRA International Journal of Multidisciplinary Research (IJMR) - Peer Reviewed Journal Volume: 7 | Issue: 8 | August 2021|| Journal DOI: 10.36713
- [11] Ailar Sabbaghi, Seyed Mohammad Miri, Mohsen Keshavarz, Mohsen Zargar, Amir Ghaemi (2019): Inactivation methods for whole influenza vaccine production. Rev Med Virol. 2019; e2074. <https://doi.org/10.1002/rmv.2074>.
- [12] Hong Zhao, Xiaoying Zhou & Yi-Hua Zhou (2020): Hepatitis B vaccine development and implementation, Human Vaccines & Immunotherapeutics, DOI:10.1080/21645515.2020.1732166.

- [13] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> WHO. Hepatitis B fact sheet. WHO media centre. Reviewed July 2017. Accessed February 2018. Retrieved
- [14] CDC. Hepatitis B; Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book 13th ed. CDC; 2015. p. 158.
- [15] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk R, Krause G, Ott J. Estimations of worldwide prevalence of chronic Hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *www.thelancet.com* Published online July 28, 2015 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
- [16] Boletín N°2 Hepatitis Virales en la Argentina. Año II – Diciembre 2020
- [17] <http://anmatvademecum.servicios.pami.org.ar> - Vademecum Nacional de Medicamentos.
- [18] Gellisen G (2002). *Hansenula polymorpha – Biology and Applications*. Wiley - VCH
- [19] Nikolaos E. Labrou (2021). *Protein Downstream Processing. Design, Development, and Application of High and Low-Resolution Methods*. Humana Press.
- [20] Gervais D (2019) Quality control and downstream processing of therapeutic enzymes. *Adv Exp Med Biol* 1148:55–80
- [21] Li Y, Stern D, Lock LL, Mills J, Ou SH, Morrow M, Xu X, Ghose S, Li ZJ, Cui H (2019) Emerging biomaterials for downstream manufacturing of therapeutic proteins. *Acta Biomater* 1(95):73–90
- [22] Łojewska E, Kowalczyk T, Olejniczak S, Sakowicz T (2016). Extraction and purification methods in downstream processing of plant based recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 2016(120):110–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.018>
- [23] Steinebach F, Muller-Spáth T, Morbidelli M (2016) Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production. *Biotechnol J* 11:1126–1141. DOI 10.1002/biot.201500354.
- [24] Grasselli M (2015). *Proteínas Puras*. Universidad Nacional de Quilmes.
- [25] *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, edited by Michael C. Flickinger Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Inc.
- [26] <https://www.sanofi.com.ar/dam/jcr:a842a494-fde0-48f3-88e4-630d0f70b44f/sanofi-fact-sheet-planta-industrial-pilar.pdf>
- [27] Process Mapping 250L Line. Documento interno de planta.
- [28] <https://www.psangelus.com/>

- [29] <https://www.jenck.com/>
- [30] Instrucción de producción de HBsAg – Etapa Downstream I. Documento interno de planta
- [31] Determinación de pureza con SDS-Page en medio reductor con coloración coomassie. Documento interno de planta.
- [32] <https://support.minitab.com> - Minitab® 17.1.0
- [33] Aleksander Cvjetkovic, Jan Lötvall & Cecilia Lässer (2014) The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles, Journal of Extracellular Vesicles, 3:1, 23111, DOI: 10.3402/jev.v3.23111
- [34] Process Mapping 50L Line. Documento interno de planta.
- [35] Annual Product Review. Reporte interno de planta
- [36] Reporte de vida útil de resina cromatográfica de IEC. Reporte interno de planta
- [37] Reporte de Desarrollo de Línea 250L de Hepatitis B. Reporte interno de planta
- [38] Registros de producción de lotes de antígeno de Hepatitis B.

ANEXOS

8. Anexos

8.1. Anexo 1: Proceso base – valores de OD600nm y pureza de IEC

OD600 (Abs)	Pureza IEC (%)	Equipo
0,36	83,3	2
0,55	82,2	1
0,38	79,6	2
0,34	79,2	2
0,71	75,7	1
0,41	80,4	2
0,35	80,0	2
0,64	78,7	1
0,38	76,6	2
0,33	78,5	2
0,70	80,0	1
0,40	77,6	2
0,42	78,3	2
0,70	78,9	1
0,48	78,6	2
0,40	77,6	2
0,71	78,6	1
0,47	79,5	2
0,35	79,5	2
0,53	77,7	1
0,41	80,8	2
0,45	79,3	2
0,55	80,3	1
0,41	80,7	2
0,39	79,8	2
0,63	77,0	1
0,38	78,7	2
0,33	80,0	2
0,60	77,4	1
0,35	79,7	2
0,37	80,8	2
0,68	78,8	1
0,39	83,7	2
0,57	78,6	1
0,40	78,0	2
0,69	78,8	1
0,41	79,7	2
0,59	78,8	1
0,38	78,2	2
0,58	80,9	1

Proceso de purificación de proteínas recombinantes: Optimización en la etapa de centrifugación del Antígeno del virus de la Hepatitis B

OD600 (Abs)	Pureza IEC (%)	Equipo
0,66	80,8	1
0,58	76,7	1
0,47	80,2	2
0,63	77,8	1
0,37	79,5	2
0,57	80,5	1
0,40	80,2	2
0,61	78,7	1
0,37	81,5	2
0,39	79,1	2
0,59	78,3	1
0,45	78,6	2
0,39	78,4	2
0,75	76,8	1
0,47	78,5	2
0,36	79,7	2
0,36	77,9	1
0,47	76,8	2
0,39	80,0	2
0,63	75,7	1
0,43	80,6	2
0,43	80,6	2
0,66	75,6	1
0,42	78,3	2
0,40	79,8	2
0,76	78,1	1
0,46	80,1	2
0,36	76,9	2
0,78	70,5	1
0,44	75,3	2
0,38	79,8	2
0,67	76,9	1
0,41	78,4	2
0,38	78,6	2
0,66	74,3	1
0,45	80,6	2
0,46	79,2	2
0,74	77,1	1
0,41	79,4	2
0,38	78,2	2
0,67	75,8	1
0,44	81,3	2
0,46	77,0	2

Proceso de purificación de proteínas recombinantes: Optimización en la etapa de centrifugación del Antígeno del virus de la Hepatitis B

OD600 (Abs)	Pureza IEC (%)	Equipo
0,64	75,8	1
0,34	77,2	2
0,47	77,3	2
0,67	74,2	1
0,47	78,3	2
0,35	78,3	2
0,62	75,5	1
0,46	78,3	2
0,42	79,1	2
0,73	78,4	1
0,43	77,9	2
0,66	78,6	1
0,42	80,6	2
0,76	81,1	1
0,35	78,1	2
0,63	78,5	1
0,39	80,3	2
0,66	85,0	1
0,46	79,6	2
0,66	78,0	1
0,34	79,8	2
0,57	78,0	1
0,37	78,6	2
0,42	80,3	2
0,60	76,5	1
0,40	78,7	2
0,36	80,9	2
0,69	75,1	1
0,42	78,6	2
0,70	76,0	2
0,84	70,1	1
0,38	75,8	2
0,37	81,9	2
0,71	77,3	1
0,42	80,2	2
0,39	79,9	2
0,58	77,6	1
0,43	78,7	2
0,42	76,9	2
0,65	75,6	1
0,50	79,9	2
0,40	79,6	2
0,64	76,6	1

OD600 (Abs)	Pureza IEC (%)	Equipo
0,45	78,3	2
0,36	80,0	2
0,66	76,3	1
0,51	77,6	2

8.2. Anexo 2: Proceso escalado – valores de OD600nm y pureza de IEC

Lote	OD600	Pureza IEC
1	1,06	78,4
2	1,22	76,1
3	0,83	76,0
4	1,05	76,8
5	1,13	75,9
6	1,35	72,3
7	1,37	73,1
8	1,65	71,6
9	1,72	74,4
10	1,46	77,2
11	1,77	74,2
12	1,12	75,1
13	1,25	73,4
14	1,02	74,8