

UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**DISEÑO DEL PROCESO *DOWNSTREAM* PARA LA
PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE PARTÍCULAS
VIRALES PARA LA COVID-19 RECUPERADAS DE
NICOTIANA BENTHAMIANA EN PERÚ.**

TESIS

Para optar el título profesional de Ingeniera Química

AUTORA

Sofía Alejandra Yañez Encalada (ORCID: 0000-0002-2665-7882)

ASESORA

Úrsula Rodríguez Zúñiga (ORCID: 0000-0001-5426-9871)

Lima – Perú

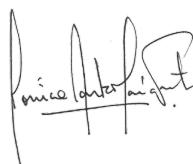
2023

DECLARACIÓN JURADA

Yo, Mónica Cecilia Santa María Fuster identificada con DNI No 18226712 en mi condición de autoridad responsable de validar la autenticidad de los trabajos de investigación y tesis de la UNIVERSIDAD DE INGENIERIA Y TECNOLOGIA, DECLARO BAJO JURAMENTO:

Que la tesis denominada “DISEÑO DEL PROCESO DOWNSTREAM PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE PARTÍCULAS VIRALES PARA LA COVID-19 RECUPERADAS DE NICOTIANA BENTHAMIANA EN PERÚ.” ha sido elaborada por la señorita Sofía Alejandra Yañez Encalada, con la asesoría de Úrsula Rodríguez Zúñiga, identificada con el DNI N° 29722081 , y que se presenta para obtener el grado de Ingeniero Químico, ha sido sometida a los mecanismos de control y sanciones anti plagio previstos en la normativa interna de la universidad, encontrándose un porcentaje de similitud de 0%.

En fe de lo cual firmo la presente.



Dra. Mónica Santa María Fuster
Directora de Investigación

En Barranco, el 06 de julio de 2023

Dedicatoria:

A Dios, por cada día de vida, por cada una de sus bendiciones y porque en todo momento está conmigo forjando mi camino.

A mi padre, por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación. A mi madre, por el ímpetu y la confianza que siempre me transmitió.

A ambos, por formarme, por brindarme su amor de manera incondicional y por apoyar mis sueños.

A mis abuelos maternos Luzmila y Alejandro, por cada día motivarme a seguir adelante pese a las adversidades. A mis abuelos paternos Olga y Raúl, por su cariño. A mi tío Alfredo, por la confianza en mí y porque siempre lo recordaré como la gran persona que fue.

A mis amigos, quienes ayudaron a que esta etapa sea inolvidable y porque me enseñaron que sin tener lazos de sangre siempre serán como una familia para mí.

A mis profesores de UTEC, quienes me apoyaron durante estos años y quienes con sus conocimientos fueron más allá de lo que les dictaba su deber.

A la tierra testigo de mi nacimiento, mi crecimiento y formación. Porque, a pesar de las diferencias, creo en la fuerza y valentía que tenemos como peruanos para llegar a construir un país mejor.

Agradecimientos:

A mi asesora, la Dra. Úrsula Rodríguez Zúñiga, quien me guio en el desarrollo de la tesis, por su compromiso en mi crecimiento profesional y personal, por la comprensión, dedicación y amabilidad que siempre ha mostrado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	18
CAPÍTULO I.....	19
OBJETIVOS.....	19
1.1. Objetivo general.	19
1.2. Objetivos específicos ^a	19
CAPÍTULO II.....	22
MARCO TEÓRICO	22
2.1 Vacunas de virus como partículas	22
2.2 Proceso de producción de vacunas de virus como partículas.....	22
2.2.1 Plantas como sistemas de producción y <i>molecular farming</i>	23
2.2.2 Descripción general del proceso (<i>upstream</i> y <i>downstream</i>).....	24
2.3 Buenas prácticas de manufactura en industrias biofarmacéuticas.....	26
CAPÍTULO III	27
ESTADO DEL ARTE	27
3.1. Producción de vacunas a base de plantas.	27
3.2. Avances en el proceso <i>upstream</i> para la producción de vacunas derivadas de células vegetales	30
3.3. Procesamiento aguas abajo (<i>DSP</i>): estrategias de recuperación y purificación de proteínas.....	33
3.3.1. Extracción.	35

3.3.2.	Clarificación.....	36
3.3.3.	Purificación.....	38
3.4.	Seguridad y regulaciones en el desarrollo de vacunas.	40
CAPÍTULO IV		42
METODOLOGÍA.....		42
4.1.	Establecimiento de la base de diseño.	43
4.2.	Construcción del BFD.	44
4.3.	Selección de parámetros del proceso aguas arriba.	44
4.4.	Definición de parámetros del proceso aguas abajo.	44
4.4.1.	Extracción.	45
4.4.2.	Clarificación.....	45
4.4.3.	Purificación.....	46
4.4.4.	Concentración y acabado.	46
4.5.	Balances de materia y energía.	47
4.6.	Software de simulación.	48
4.7.	Diseño de equipos del procesamiento aguas abajo.....	48
4.7.1.	Diseño de la unidad de extracción.	48
4.7.2.	Diseño de los equipos de la etapa clarificación.	50
4.7.3.	Diseño de los equipos de la etapa de purificación.	52
4.7.4.	Diseño de equipos auxiliares.	55
4.8.	Construcción del PFD.....	55
4.9.	<i>Scheduling</i> del proceso.	56
4.10.	Evaluación de la seguridad del proceso en base a las BPM.	56
4.11.	Evaluación económica del proceso.....	58

4.11.1.	Costo de capital (CAPEX).	58
4.11.2.	Costo de operación (OPEX).	58
4.11.3.	Costo unitario de producción.	59
4.11.4.	Índices de rentabilidad (VAN y TIR).	59
CAPÍTULO V		60
RESULTADOS Y DISCUSIONES		60
5.1.	Establecimiento de la base de diseño.	60
5.2.	Construcción del BFD.	61
5.3.	Selección de parámetros del proceso <i>upstream</i> .	62
5.4.	Definición de parámetros del proceso aguas abajo.	62
5.5.	Balances de materia y energía.	64
5.6.	Diseño y dimensionamiento del procesamiento <i>downstream</i> .	82
5.6.1.	Diseño de la etapa de separación y extracción.	82
5.6.2.	Diseño de la etapa de clarificación.	85
5.6.3.	Diseño de la etapa de purificación.	88
5.6.4.	Diseño de etapa de concentración y acabado.	96
5.6.5.	Diseño de equipos auxiliares.	104
5.7.	Construcción del PFD.	106
5.8.	<i>Scheduling</i> del proceso.	108
5.9.	Evaluación de seguridad del proceso en base a las BPM.	111
5.10.	Evaluación económica del proceso.	121
5.10.1.	Estimación del CapEx asociado al proceso.	121
5.10.2.	Estimación del OpEx asociado al proceso.	126
5.10.3.	Estimación del costo unitario de producción.	129

5.10.4.	Cálculo de índices de rentabilidad del proyecto (VAN y TIR).....	129
5.10.5.	Análisis de sensibilidad.....	131
CAPÍTULO VI.....		135
CONCLUSIONES.....		135
CAPÍTULO VII.....		138
RECOMENDACIONES		138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		139
ANEXOS		150

ABREVIATURAS

BPM Buenas prácticas de manufactura

cGMP Buenas prácticas de manufactura actuales, por su nombre en inglés *Current Good Manufacturing Practices*.

CBF Instalación de biofabricación clínica, por su nombre en inglés *Clinical BioManufacturing Facility*.

DSP Procesamiento aguas abajo, por su nombre en inglés *Downstream Processing*.

HCP Proteínas de la célula huésped, por su nombre en inglés *Host Cell Proteins*.

HCCF Fluido de cultivo celular recolectado, por su nombre en inglés *Harvest Cell Culture Fluid*.

mAb Anticuerpo monoclonal, por su nombre en inglés *Monoclonal antibody*

PTM Modificación post-traducciona, por su nombre en inglés *Post-translational Modification*.

VLP Virus como partículas, por su nombre en inglés *virus-like particles*.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Principales operaciones de separación en el procesamiento aguas abajo.	26
Tabla 3.1. Proteínas terapéuticas basadas en VLPs producidas en células vegetales en los últimos 10 años que han alcanzado la etapa de ensayo clínico en humanos y productos farmacéuticos humanos aprobados por la FDA..	29
Tabla 4.1. Parámetros a considerar para la especificación del producto.	43
Tabla 4.2. Parámetros definidos para la extracción	45
Tabla 4.3. Parámetros definidos para las etapas de purificación	46
Tabla 4.4. Parámetros definidos para la concentración.	47
Tabla 4.5. Definición de variables a utilizar en el diseño de la centrífuga de discos..	48
Tabla 4.6. Parámetros para el diseño de una centrífuga de disco...	50
Tabla 4.7. Parámetros de las ecuaciones presentadas para la etapa de filtración.	52
Tabla 4.8. Parámetros de las ecuaciones presentadas en el diseño de los equipos de purificación..	53
Tabla 5.1. Parámetros definidos para la especificación del producto.....	61
Tabla 5.2. Parámetros definidos del proceso aguas arriba para la producción de vacunas de partículas virales contra la COVID-19.....	63
Tabla 5.3. Parámetros definidos del proceso aguas abajo para la producción de vacunas de partículas virales contra la COVID-19..	63
Tabla 5.4. Cálculos para la determinación de la cantidad de sólidos en la corriente de entrada a la centrífuga de discos primaria.....	66
Tabla 5.5. Cálculos y resultados de las corrientes de la centrifugación primaria..	68
Tabla 5.6. Balance de masas en la primera centrifugación.....	70

Tabla 5.7. Cálculos y resultados de las corrientes de alimentación de la homogeneización de alta presión..	72
Tabla 5.8. Balance de masas en el homogeneizador de alta presión..	73
Tabla 5.9. Cálculos y resultados de las corrientes de alimentación de la centrífuga secundaria..	75
Tabla 5.10. Balance de masas en la segunda centrifugación...	77
Tabla 5.11. Porcentajes asumidos de reducción de componentes en el filtro de profundidad.....	79
Tabla 5.12. Balance de masas en la filtración de profundidad..	79
Tabla 5.13. Características de la centrífuga de discos 1 (Westfalia SC35)...	82
Tabla 5.14. Determinación del término principal de la ecuación que modela el proceso del rompimiento celular a partir de datos de la literatura.	82
Tabla 5.15. Cálculos de diseño del homogeneizador de alta presión..	84
Tabla 5.16. Especificaciones técnicas del homogeneizador de alta presión elegido	84
Tabla 5.17. Definición de parámetros de diseño con datos extraídos de la literatura para la centrífuga de discos 2	85
Tabla 5.18. Variables de diseño calculadas para la centrífuga de discos 2.....	85
Tabla 5.19. Características de la centrífuga de discos 2 (Westfalia SC35) ...	86
Tabla 5.20. Características del filtro de profundidad.....	87
Tabla 5.21. Parámetros de diseño y adsorción del arreglo de columnas cromatográficas de afinidad... ..	90
Tabla 5.22. Determinación de la productividad y otros parámetros de diseño a partir de las curvas de breakthrough.....	92
Tabla 5.23. Volúmenes de solución buffer necesario por ciclo en la columna de afinidad... ..	93
Tabla 5.24. Balance de materia en columna cromatográfica de afinidad... ..	93

Tabla 5.25. Características del arreglo de columnas cromatográficas de afinidad	94
Tabla 5.26. Principales características de la columna AEX y de la resina....	95
Tabla 5.27. Balance de materia en la etapa de cromatografía AEX. .	96
Tabla 5.28. Balance de materia en la etapa de concentración (UF/DF).	98
Tabla 5.29. Balance de materia en la etapa de dilución.....	100
Tabla 5.30. Especificaciones del equipo de dilución Mobius Power MIX.....	101
Tabla 5.31. Balance de materia en la etapa de filtración estéril.	102
Tabla 5.32. Balance de materia en la etapa de acabado.....	103
Tabla 5.33. Dosis por lote luego de la etapa de formulación.....	104
Tabla 5.34. Selección de equipos auxiliares.....	105
Tabla 5.35. Lista de actividades y sus detalles para fines del <i>scheduling</i>	109
Tabla 5.36. Riesgos asociados a las etapas del proceso según los grados estipulados por las BPM para procesos biofarmacéuticos.	112
Tabla 5.37. Peligros y riesgos asociados al proceso	115
Tabla 5.38. Descripción general de las medidas de contención y su implementación luego de la identificación de peligros y riesgos en el proceso.....	119
Tabla 5.39. Costos de los equipos asociados al proceso de producción de VLPs.	122
Tabla 5.40. Costos directos (DC), costos indirectos (IC) y otros costos (OC) asociados al proceso.....	125
Tabla 5.41. Costos de materia prima por lote.	126
Tabla 5.42. Costos variables asociados al proceso.	128
Tabla 5.43. Costos fijos de operación.....	128
Tabla 5.44. Estimación del costo unitario de producción.....	129
Tabla 5.45. Resultados del análisis económico del caso de estudio.	130
Tabla 5.46. Parámetros del análisis de sensibilidad.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Posibles rutas de síntesis usadas en la agricultura molecular.....	23
Figura 2.2. Representación de las principales etapas del proceso upstream y downstream..	24
Figura 2.3. Principales etapas del proceso aguas arriba... ..	25
Figura 3.1. Representación sobre la producción de vacunas a base de plantas para combatir la COVID-19.....	32
Figura 4.1. Diagrama de flujo para el desarrollo de la metodología del proyecto de investigación.	42
Figura 4.2. Diagrama de flujo para el desarrollo del balance de masa y energía de cada uno de los equipos.....	47
Figura 4.3. Diagrama de flujo de un algoritmo para la identificación de peligros del proceso propuesto	57
Figura 5.1. Diagrama de bloques de la producción de vacunas de partículas virales a base de <i>nicotiana benthamiana</i>	62
Figura 5.2. Esquema para la primera etapa del procesamiento aguas abajo	71
Figura 5.3. Esquema para la segunda etapa del procesamiento aguas abajo	74
Figura 5.4. Esquema para la tercera etapa del procesamiento aguas abajo.	78
Figura 5.5. Esquema para la cuarta etapa del procesamiento aguas abajo.	80
Figura 5.6. Ajuste polinomial de la ecuación que modela el proceso del rompimiento celular con los datos obtenidos de la Tabla 5.9.	83
Figura 5.7. Diagrama del arreglo de columnas propuesto (3C-PCC).....	89
Figura 5.8. Curva de breakthrough para tres velocidades diferentes.....	91

Figura 5.9. Esquema representativo de la etapa de UF/DF.	97
Figura 5.10. Sistema de UF/DF de la marca Pall (izquierda) y membranas en forma de cassettes Pall Cadence de un solo uso (derecha)..	100
Figura 5.11. PFD del proceso propuesto incluyendo la etapa aguas arriba y la etapa de formulación.	107
Figura 5.12. Scheduling del proceso para el caso base.	110
Figura 5.13. Estrategia general para el análisis de seguridad del proceso.	114
Figura 5.14. Análisis de sensibilidad para una proyección de 5 años variando el CapEx y el precio por dosis de vacuna.	132
Figura 5.15. Análisis de sensibilidad para una proyección de 5 años variando el costo de la materia prima principal del proceso y las dosis por lote.	133

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Glosario de términos.....	152
Anexo 2: Tipos de diseño de investigación asociados a los objetivos específicos planteados	154
Anexo 3: Tipos de vacunas en desarrollo.....	155
Anexo 4: Ventajas y desventajas de diversas tecnologías utilizadas en la extracción, clarificación y purificación de vacunas a base de plantas.....	158
Anexo 5: Porcentajes de deducción típicos utilizados para el cálculo de la inversión de capital fijo (FCI).	160
Anexo 6: Consideraciones y términos para la determinación del OPEX.....	161
Anexo 7: Diagrama BFD.....	162
Anexo 8: Balance de masas del proceso.....	163
Anexo 9: Corrientes de energía en el proceso.	164
Anexo 10: Composiciones de las soluciones buffer en el arreglo de columnas cromatográficas de afinidad.....	165
Anexo 11: Código en Matlab para determinar las curvas de <i>breakthrough</i> en la columna cromatográfica de afinidad.	166
Anexo 12: Diagrama PFD.	169
Anexo 13: Resultados del análisis de sensibilidad del proyecto.	170

RESUMEN

Se realizó el diseño de un proceso aguas abajo (*downstream*) para la producción de vacunas de partículas virales para la COVID-19 recuperadas de *Nicotiana benthamiana* en Perú tomando como modelo de expresión del gen viral antígeno por el método de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta planta fue seleccionada para actuar como biorreactor con condiciones definidas (temperatura, periodo de crecimiento, método de infiltración, etc) a partir de la revisión bibliográfica en el campo de estudio. El proceso *downstream* consta de 4 principales etapas: la extracción (centrífuga de discos primaria y homogeneizador de alta presión), clarificación (centrífuga de discos secundaria y filtro de profundidad), purificación (cromatografía de afinidad y de intercambio aniónico), concentración y acabado (ultrafiltro, filtro estéril y equipo de formulación). Para el estudio, se definió una capacidad de producción de 600 kg biomasa de *Nicotiana benthamiana* con la VLPs/lote y se establecieron los parámetros operacionales para los equipos propuestos. Se realizaron los balances de materia y energía para dimensionar los equipos considerando las variables de diseño y las condiciones de operación para cada unidad. La etapa de cromatografía de afinidad fue diseñada utilizando modelos matemáticos que describen la cinética de adsorción, para lo cual se empleó el *software* CADET en Matlab y se determinó que un arreglo cromatográfico de tres columnas en contracorriente operando de manera continua a una velocidad de alimentación de 200 cm/h permite obtener una productividad de 8.58 g/L/h. Al final del proceso, se llegan a obtener a obtener 371 g de producto/lote, que generan aproximadamente 89.9 millones de dosis por lote, considerando las especificaciones de las BPM en industrias biofarmacéuticas. Asimismo, se determinó que, en el año se pueden producir 8 lotes, de modo que se determinaron indicadores económicos en términos del VAN y el TIR, con valores de 207 363 636.35 USD y 76% respectivamente. Así, se llegó a la conclusión que el proyecto es viable y rentable en las condiciones evaluadas en este trabajo.

PALABRAS CLAVE:

Vacuna de VLPs; *Nicotiana benthamiana*; *Downstream*, Cromatografía de afinidad.

ABSTRACT

DOWNSTREAM PROCESS DESIGN FOR THE PRODUCTION OF COVID-19 VIRUS-LIKE PARTICLES VACCINES RECOVERED FROM NICOTIANA BENTHAMIANA IN PERU.

The design of a *downstream* process for the production of virus-like particle vaccines for COVID-19 recovered from *Nicotiana benthamiana* in Peru was carried out using *agrobacterium tumefaciens* method as an advantageous expression system of the viral antigen gene. The plant was selected to act as a bioreactor in order to produce viral particles under certain conditions defined from a literature review (temperature, growing period and agroinfiltration method). The downstream process consists of four main stages: extraction (primary disc centrifuge and high-pressure homogenizer), clarification (secondary disc centrifuge and depth filter), purification (affinity and anion exchange chromatography) and concentration and formulation (ultrafilter, sterile filter and formulation equipment). A production capacity of 600 kg biomass/batch was defined and the operational parameters for the proposed equipment were also established. The mass and energy balances were carried out to select each equipment regarding the design heuristics and operating conditions of the process stages. The affinity chromatography stage was depicted mathematically using adsorption models to describe the process kinetic by the Langmuir isotherm. *Matlab* simulation software was used to solve the differential equations that represent the process model and the initial flow rates were modified. The best results were obtained when operating continuously in a three-column period counter-current chromatographic array at 200 cm/h which allows to obtain a productivity of 8.58 g/L/ h. The purity requirements according to the specifications of the Good Manufacturing Practices in biopharmaceutical industries and the biological risks associated to the process were evaluated obtaining 371 g of purified and formulated product, which provides approximately 89.9 million doses per batch. Based on

each activity in the process, 8 batches are obtained per year, the viability was determined in terms of NPV (207 363 636.35 US\$) and IRR (76%), concluding that it is viable and profitable.

KEYWORDS:

VLPs vaccine; *Nicotiana benthamiana*; Downstream, Affinity chromatography.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, se ha demostrado que las vacunas representan estrategias eficaces para prevenir e incluso erradicar la propagación de enfermedades [1]. No obstante, para su administración se requieren años de investigación y desarrollo, así como la superación de pruebas clínicas en varias fases para demostrar su inocuidad y eficacia. La pandemia del SARS-CoV-2 que surgió en China en diciembre del 2019 se extendió rápidamente a otros países a nivel mundial, siendo declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) emergencia sanitaria global [2]. Por tal motivo, distintos equipos de investigación de universidades y empresas farmacéuticas desarrollaron técnicas y procesos como medidas de control y prevención que permitieron contener la crisis de salud derivada [3].

Hasta la última semana de diciembre del 2021, un año después de la finalización de los ensayos clínicos de la vacuna genética de Pfizer, existían 90 candidatas a vacunas contra la COVID-19 que se encontraban en ensayos clínicos en humanos, 27 llegaron a las etapas finales de prueba, 6 fueron utilizadas con ciertas restricciones y 8 se produjeron a nivel comercial siendo aprobadas y administradas en muchos países [4].

En tal sentido, entre las tecnologías más importantes para el desarrollo y la producción de vacunas contra la COVID-19, se tienen a las vacunas basadas en vectores virales (entre las principales se encuentra la vacuna desarrollada por la Universidad de Oxford y la compañía farmacéutica AstraZeneca), las vacunas de virus inactivado (entre las principales se encuentran las vacunas Sinopharm y Sinovac) y las vacunas genéticas de ARN (como la vacuna Pfizer desarrollada con la compañía farmacéutica BioNTech) [5]. Si bien, la producción de vacunas comerciales es una realidad que permite la inmunización de poblaciones enteras, la aplicación y distribución en situaciones pandémicas suele ser desigual, ya que la cadena de manufactura está centralizada en aquellos países que cuentan con tecnología e infraestructura de producción biofarmacéutica [6]. Esto, debido a que la cadena de producción de la industria requiere de elevadas inversiones en costo de capital por

la sofisticación de los equipos, personal técnico altamente especializado, regulaciones gubernamentales adecuadas y controles farmacológicos estrictos [7].

Así, la carencia de industrias biofarmacéuticas en países emergentes, sumado a otros desafíos logísticos, tiene como consecuencias que, en Perú no se tenga una estrategia de respuesta rápida ante futuras situaciones pandémicas y el surgimiento de nuevas variantes de preocupación [8],[9]. En ese contexto, una alternativa a los procesos de producción comercial es la producción de vacunas de partículas virales derivadas de células vegetales. Esta tecnología, basada en los principios del *molecular farming* (o agricultura molecular de plantas), [10] viene siendo estudiada por la comunidad científica, ya que su proceso de producción muestra diversas ventajas. Entre las cuales se tienen que la agricultura molecular de plantas presenta menores requerimientos en esterilidad al inicio del proceso, lo cual se traduce en menores necesidades energéticas, y una menor inversión de capital inicial. Asimismo, al ser el proceso más simplificado, la respuesta ante situaciones pandémicas es más rápida [11]. Desde el plano corporativo, la biofarmacéutica canadiense Medicago ha sido autorizada por *Health Canada* en enero del 2022 para comercializar su vacuna de partículas virales a base de *Nicotiana benthamiana*. No obstante, la evaluación técnica se enfoca en la producción a gran escala, mostrando equipos de fácil implementación en contextos que cuentan con capacidad de producción en industrias biofarmacéuticas [12]. En países sin tecnologías farmacéuticas avanzadas, las ventajas mencionadas requieren una verificación preliminar mediante una evaluación técnica y económica del proceso a nivel de diseño conceptual. Asimismo, algunos factores como la productividad de las operaciones de extracción y purificación de partículas virales, necesitan de un análisis particular dada la complejidad involucrada, como también a las regulaciones para su aprobación [13]. Finalmente, existen marcos regulatorios específicos en cada país que deben ser establecidos antes de que esta industria de rápido crecimiento a nivel de investigación y desarrollo pueda competir eficazmente en el sector biofarmacéutico [14].

Tomando como base lo anterior, el presente proyecto de tesis tiene como pregunta de investigación ¿Es factible económicamente diseñar un proceso *downstream* para la producción de vacunas de partículas virales para la COVID-19 recuperadas de *Nicotiana*

benthamiana en Perú?. Para ello, se define la capacidad de producción, se establecen los parámetros operacionales del proceso de producción aguas arriba (*upstream*) de las vacunas de VLPs (selección de la planta como sistema de producción de partículas virales, método de infiltración, condiciones de temperatura y humedad óptimas para definir la capacidad de producción, etc.) a partir de recientes investigaciones en el campo de estudio. Asimismo, en relación al proceso aguas abajo (*downstream*), se identificaron y diseñaron las operaciones de rompimiento celular, remoción de desechos, clarificación, purificación, concentración y acabado de las partículas virales en la plataforma seleccionada siguiendo las buenas prácticas de biomanufactura. De igual manera, se usaron modelos matemáticos representativos de cada equipo para su dimensionamiento utilizando el software *Matlab*. Finalmente, toda esta información integra la viabilidad técnica en base a la bioseguridad y, posteriormente, se verificaron los índices económicos del proceso propuesto.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

Diseñar un proceso *downstream* para la producción de vacunas de partículas virales para la COVID-19 recuperadas de *Nicotiana benthamiana* en Perú.

1.2. Objetivos específicos ^a.

- Determinar la capacidad de producción del proceso a partir de información bibliográfica de plataformas convencionales de producción de vacunas de VLPs derivadas de células vegetales.
- Establecer los parámetros operacionales del proceso de producción aguas arriba^b de las vacunas de VLPs para definir las condiciones de entrada en el proceso aguas abajo.
- Dimensionar los equipos de las operaciones de extracción, clarificación, purificación, concentración y acabado de vacunas de VLPs en base a los balances de materia y energía y a la capacidad de diseño seleccionada.
- Evaluar la seguridad del proceso en base a las buenas prácticas de manufactura de procesos biofarmacéuticos y la viabilidad económica en términos del VAN y el TIR.

^aEl diseño de investigación a seguir para cada objetivo específico se encuentra en el Anexo 2.

^b El proceso aguas arriba se define desde el cultivo y aislamiento celular temprano hasta la cosecha final y el proceso aguas abajo se define como el procesamiento donde la masa celular de la corriente producida aguas arriba se procesa para cumplir con los requisitos de pureza y calidad según las BPM en bioprocesos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se presenta la base teórica sobre las vacunas de partículas similares a virus en base a *Nicotiana benthamiana*, los principales conceptos para comprender el procesamiento *downstream* de esta tecnología, así como las buenas prácticas de manufactura en industrias biofarmacéuticas. En ese sentido, se describe de manera general el proceso desde la elección del sistema de producción (etapa *upstream*) hasta las etapas de rompimiento celular, remoción de desechos, clarificación, purificación, concentración y acabado. Todas estas etapas contemplan normas estipuladas en las buenas prácticas de manufactura de procesos biofarmacéuticos. Además, en el Anexo 1 se presenta un glosario de términos relacionados con el presente trabajo de tesis.

2.1 Vacunas de virus como partículas

Las vacunas de partículas similares a virus (VLP de su nombre en inglés *virus-like particles*) son estructuras proteicas compuestas por una o más moléculas diferentes con la capacidad de autoensamblarse molecularmente, imitando la forma y el tamaño de una partícula viral sin material genético infeccioso [15]. Asimismo, este tipo de vacunas contienen proteínas virales funcionales responsables de la penetración del virus SARS-CoV-2 en las células, por lo que, se obtiene una entrada celular eficiente y específica.

2.2 Proceso de producción de vacunas de virus como partículas.

En relación al uso de agricultura molecular para la producción de vacunas basadas en VLP, el principal desafío para su amplia aplicación reside en el escalamiento de nuevas plataformas de producción más eficientes y con menores costos de manufactura. En tal sentido, en esta sección se realiza la descripción de la selección de los organismos vegetales como sistema de producción y una descripción general del proceso de la producción de este tipo de vacunas.

2.2.1 Plantas como sistemas de producción y *molecular farming*.

Los organismos vegetales como sistemas de expresión de las proteínas recombinantes constitutivas de las VLP (obtenidas a partir de una línea celular distinta a la célula original) tienen como objetivo producir estas proteínas a elevadas concentraciones. La elección de la línea productora es muy importante ya que las membranas que envuelven las VLPs contienen proteínas de interés farmacéutico. Este proceso a nivel celular involucra las siguientes etapas: la construcción del vector con la secuencia genética que codifica la proteína de interés, la transfección de las células con el vector, la traducción de los genes a proteínas y la expresión en cultivos celulares como se muestra en la **Figura 2.1**.

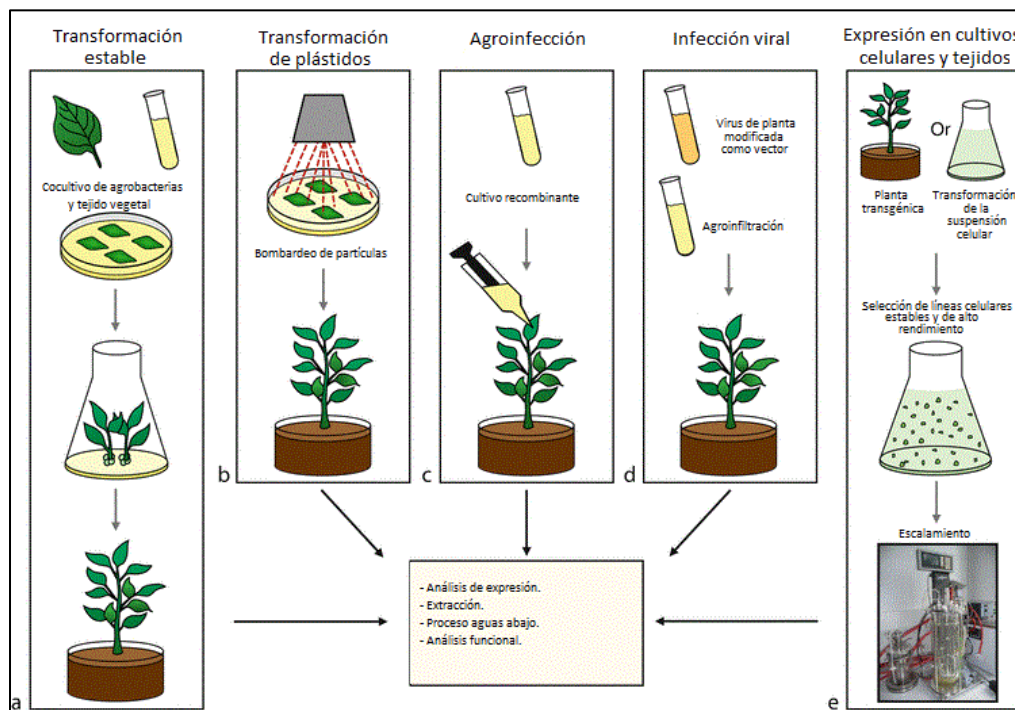


Figura 2.1. Posibles rutas de síntesis usadas en la agricultura molecular [16]. **A.** Transformación estable: transformación seguida de la integración del ADN en el genoma de la célula huésped. **B.** Transformación de pláستidos: implica la transformación de una o unas pocas copias de ADN, seguida de la dilución gradual de portadores de copias no transformadas en un medio selectivo. **C-D:** Agroinfección o infección viral: Procedimiento para introducir un virus vegetal en un hospedador a través de *Agrobacterium tumefaciens*, que puede transferir eficazmente una porción del pláستido (ADN-T) a células vegetales. **E.** Expresión en cultivos celulares y tejidos: Cuando la planta ya tiene expresado el gen viral antígeno, se hace una selección de líneas celulares con alto rendimiento para dar inicio a su escalamiento.

Asimismo, entre las principales ventajas del uso de células vegetales que funcionan como biorreactores se tienen menores costos de mantenimiento y buena capacidad para implementar modificaciones luego de la síntesis ribosomal eucariota [20]. Por otro lado, la flexibilidad en la escalabilidad del proceso, el bajo riesgo de introducir patógenos humanos y la economía al prescindir de costosas instalaciones de cultivo celular para la generación de biomasa son algunas de las principales razones por las cuales se decide emplear a los organismos vegetales como sistemas de producción al tener disminuciones significativas de los costos de capital [17].

2.2.2 Descripción general del proceso (*upstream* y *downstream*).

En bioprocesos, el procesamiento *upstream* tiene como principal objetivo el lograr un crecimiento celular a gran escala a partir de pequeñas cantidades de una variedad de líneas celulares. Posterior al cultivo y la recolección de las células, estas necesitan ser recuperadas y purificadas. En ese sentido, en proceso *downstream* implica la fabricación de un producto final purificado como se aprecia en la **Figura 2.2**.

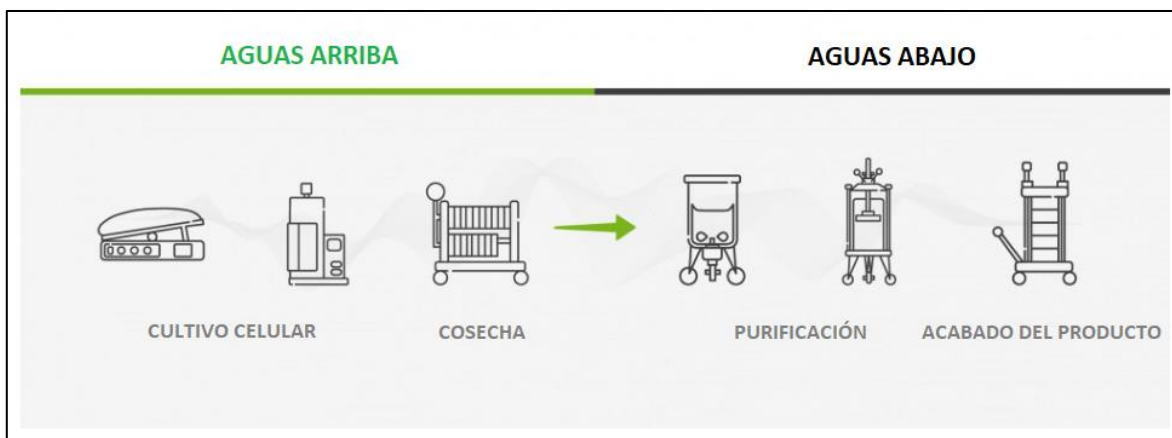


Figura 2.2. Representación de las principales etapas del proceso *upstream* y *downstream*. Adaptada de [18].

En el caso del proceso *upstream* utilizando organismos vegetales como plataforma de producción, este inicia con la siembra de estos organismos en un invernadero, ambiente que permite asegurar condiciones controladas de iluminación y nutrición. Seguidamente, se procede a la infiltración de los vectores virales en células vegetales cuya función es instruir

a las células para sintetizar la proteína deseada (expresión celular), y finalmente en la cosecha es donde se extraen las proteínas como se muestra en la **Figura 2.3** [19].

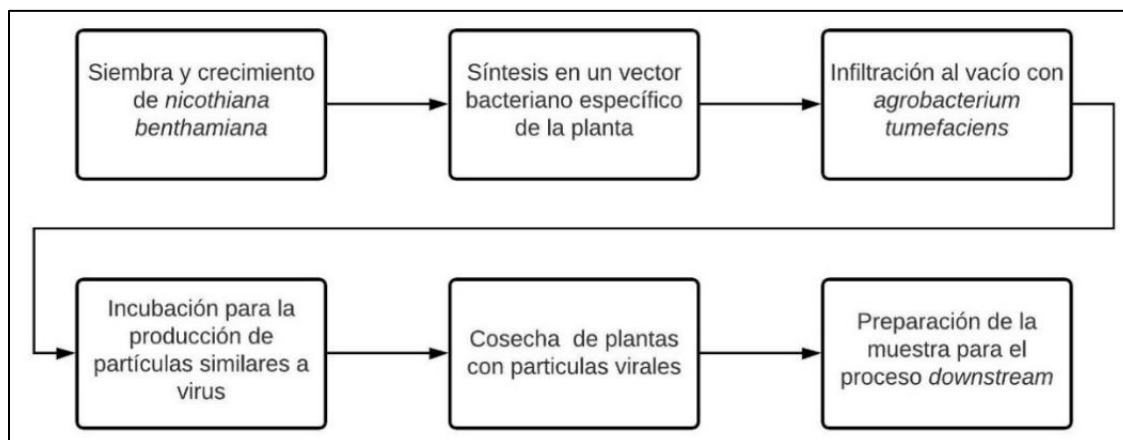


Figura 2.3. Principales etapas del proceso aguas arriba. Elaboración propia basada en [6].

Si bien, es necesaria una expresión de alto nivel para proporcionar buenos rendimientos en los sistemas de producción basados en células vegetales, también se debe optimizar la recuperación eficiente de proteínas recombinantes. Consecuentemente a la producción de las proteínas recombinantes en la matriz celular vegetal, estas deben pasar por sistemas de separación, clarificación, purificación, concentración y acabado, etapas que constituyen el proceso aguas abajo.

Como objetivos de esta fase se pueden mencionar: el aislamiento de la proteína de interés del sistema de producción vegetal, así como la preservación de la estructura de los VLPs garantizando el cumplimiento de los procedimientos de fabricación con las regulaciones actuales de buenas prácticas de manufactura [20]. Dada la naturaleza estructural de los VLPs, el procesamiento aguas abajo depende del tamaño, la forma y la arquitectura de las partículas ensambladas, así como del sistema de producción elegido. En la **Tabla 2.1**, se muestran las principales etapas y operaciones unitarias de separación que son utilizadas en el proceso *downstream*.

Etapa	Método (operación unitaria)	Propiedad
Eliminación de impurezas/preparación de la materia prima	Centrifugación	Tamaño, densidad
	Filtración	Tamaño
	Disrupción celular con ultra-sonicación	Estructura celular
Recuperación del producto	Cromatografía de afinidad o de intercambio iónico	Depende de la fase estacionaria
Pulido del producto	Cromatografía de afinidad	Depende de la fase estacionaria
	Cristalización	Punto de fusión o solubilidad
	Secado	Temperatura, humedad
Concentración de la solución	Ultrafiltración (UF/DF)	Tamaño molecular
	Precipitación	Solubilidad
	Extracción líquido-líquido	Distribución entre fases
	Adsorción	Sorción superficial

Tabla 2.1. Principales operaciones de separación en el procesamiento aguas abajo [21].

2.3 Buenas prácticas de manufactura en industrias biofarmacéuticas

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son una serie de normas y directrices que garantizan que los productos (suministros clínicos) cuenten con una calidad apropiada y estandarizada durante y al final del proceso [22][23]. Para lograr lo anterior y garantizar un producto de buena calidad en procesos a gran escala, es necesario un control de calidad ambiental (entre los que se incluyen higiene, validación, autoinspección, documentación, verificación área estéril, etc.) preciso en las instalaciones y evitar la contaminación cruzada en base a la fabricación de productos biológicos como punto clave para el diseño y operación de las instalaciones de bioprocesamiento [24]. En este contexto, las Instalaciones Modelo de Biofabricación Clínica (CBF) son unidades de producción controladas con los lineamientos de las cGMP para garantizar las demandas de dosis en los ensayos clínicos de fase I / II y la puesta a punto de nuevos productos biotecnológicos.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

En este acápite se presenta una revisión de la literatura sobre los avances en ingeniería en el desarrollo de vacunas contra la COVID-19 (Anexo 3). Se tratan los temas actualizados como el proceso para la producción de vacunas a base de plantas, investigaciones en el proceso aguas arriba para la recuperación de vacunas de VLP a base de células vegetales como una tecnología prometedora, el procesamiento aguas abajo y los avances en las estrategias de recuperación y purificación de proteínas. Finalmente, se mencionarán las principales normas de bioseguridad y las agencias reguladoras pertinentes en la manufactura biofarmacéutica.

3.1. Producción de vacunas a base de plantas.

Las vacunas constituidas de subunidades recombinantes, se producen generalmente de forma comercial mediante fermentación a escala industrial en bacterias, levaduras o células animales. No obstante, recientemente las plantas y células vegetales se han utilizado como plataformas de producción, pues ofrecen ventajas sobre los sistemas tradicionales en términos de economía, escalabilidad y opciones de formulación [25]. Los avances científicos han permitido la maduración de la tecnología de producción de vacunas basadas en células vegetales, aunque aún existen desafíos relacionados con los marcos regulatorios para ser integrados en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) aplicadas a estos sistemas.

En ese sentido, una investigación realizada por Desai et al. en 2010 [26] menciona que la vacuna contra la enfermedad de Newcastle para aves de corral fue el primer producto farmacéutico derivado de plantas en ser aprobado luego de pasar por las 4 fases clínicas validados con una gran cantidad de datos de inmunogenicidad derivados de 5 estudios anteriores. Así pues, la rápida producción y escalamiento en la manufactura que es posible

en las plataformas vegetales permite enfrentar de manera rápida a las amenazas de una pandemia según Desai et al. [26]. Por otro lado, ese mismo año investigadores de la biofarmacéutica Medicago lograron producir a gran escala la vacuna contra una cepa emergente contra el virus de la influenza 30 días después de aislar la secuencia de la proteína. Aunque, la vacuna Medicago tuvo resultados satisfactorios en el estudio clínico de fase I para demostrar su seguridad, una de las dificultades presentadas fue la aceptación de estas terapias recombinantes basadas en plantas sin abordar las cuestiones de bioseguridad relacionadas con el impacto ambiental y la evaluación de riesgos derivados de la liberación del cultivo a escala agrícola de plantas transgénicas utilizadas por esta empresa [26], [27].

A la actualidad, las perspectivas para el uso cada vez mayor de plantas para la fabricación de productos farmacéuticos en general parecen cada vez más prometedores, pues como se aprecia en la **Tabla 3.1** muchos de estos han alcanzado la etapa de ensayos clínicos en humanos y han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés). Especialmente con la reciente aprobación y licencia de la enzima terapéutica glucocerebrosidasa de la enfermedad de Gaucher producida por células de zanahoria de *Protalix* [28].

Producto	Enfermedad objetivo	Planta	Etapas de desarrollo
Vacuna contra la influenza A H5N1 HA VLPs envueltas	Gripe pandémica	<i>N. benthamiana</i>	Fase I-II [29].
Vacuna contra la influenza AH1N1 HA VLPs envueltas	Gripe estacional	<i>N. benthamiana</i>	Fase I [30].
Vacuna basada en VLP no envueltos de NvCP	Virus de Norwalk	Papa y tabaco	Fase I [31].
Vacuna basada en VLP envueltos de HBsAg	Hepatitis B	Tabaco	Fase I [32].

Vacuna basada en VLP envueltos de HBsAg	Hepatitis B	Lechuga	Fase I [32].
Vacunas basadas en partículas de AIMV que muestran glucoproteína de la rabia	Virus de la rabia	Espinaca	Fase I [33].
Enzima terapéutica Glucocerebrosidasa^a ^a La glucocerebrosidasa no es una vacuna basada en VLP, sino una enzima terapéutica para la enfermedad de Gaucher	Enfermedad de Gaucher	Cultivo celular de zanahorias	Aprobado por la FDA en el año 2013 [34].

Tabla 3.1. Proteínas terapéuticas basadas en VLPs producidas en células vegetales en los últimos 10 años que han alcanzado la etapa de ensayo clínico en humanos y productos farmacéuticos humanos aprobados por la FDA. (AIMV: virus del mosaico de la alfalfa, HA: hemaglutinina, NVCP: proteína de la cápside del virus de Norwalk).

Asimismo, se han mostrado aumentos significativos en el rendimiento de la producción de antígenos virales, en gran parte como resultado de la aplicación de sofisticadas técnicas de expresión transitoria (transformación a través de plásmidos o mediante una transformación estabilizada) que son tendencia en la industria. Así pues, la importante validación de la sencillez en la producción de vacunas de VLPs derivadas de células vegetales con altos rendimientos, tan eficaces como las vacunas cultivadas en células de insectos o mamíferos, y probablemente mucho más económicas y seguras de fabricar y aplicar que las vacunas de virus atenuados, hacen que esta tecnología sea una alternativa escalable de biomanufactura [35].

3.2. Avances en el proceso *upstream* para la producción de vacunas derivadas de células vegetales

La agricultura molecular basada en plantas (*plant-based molecular farming*), se ha investigado como una alternativa económica para la producción de proteínas recombinantes en los últimos 10 años. Esta tecnología incluye el cultivo de proteínas en plantas transgénicas, la expresión transitoria por agroinfiltración en plantas y tejidos vegetales, plantas infectadas con virus y cultivos en suspensión de células vegetales [36] .

En el año 2016, Moustafa et al. [17] investigaron que células vegetales cultivadas en suspensión *in vitro* en condiciones ambientales controladas (pH, luz, temperatura, etc.) ofrecen ventajas que incluyen una rápida escalabilidad, un bajo costo y un riesgo significativamente reducido de contaminación humana en comparación con otros sistemas de producción de proteínas. Y a pesar de que esta plataforma se ha utilizado principalmente para la producción de metabolitos medicinales en los últimos años, aún existen deficiencias a ser superadas, entre las cuales se tiene a los bajos niveles y la baja estabilidad de producción de proteínas y los problemas de bioseguridad y aceptabilidad pública relacionados con la posible dispersión de transgenes a organismos no objetivo [17].

Un avance muy importante para la agricultura molecular ha sido el desarrollo de protocolos para aumentar los rendimientos e implementar la producción a escala industrial en el procesamiento aguas abajo. Así pues, tal como lo menciona Rybicki [37] en una investigación utilizando *N. tabacum* /*N. Glauca* híbrido como plataforma de producción de proteínas, este sistema no sintetiza subproductos interferentes y se puede propagar fácilmente por fragmentos pequeños de tallos. Finalmente, al no producirse polen, se resguarda en gran medida la bioseguridad del laboratorio. Asimismo, [37] señala también que la aplicación de esta técnica resulta ser más ventajosa para los ingenieros químicos, debido a que fue posible optimizar los medios de cultivo para la producción de proteínas recombinantes en células de tabaco transgénicas, siendo este resultado favorable para el proceso aguas abajo. Cabe mencionar que, se logró aumentar el rendimiento de las proteínas recombinantes con mejoras de hasta 31 veces más en medios de cultivo luego de 10 días de cultivo en comparación con el uso de medios estándar.

Por otro lado, en el año 2019 Buyel [11] investigó el efecto de integrar dos productos secundarios, es decir, una proteína adicional y una molécula pequeña, en la economía general del proceso para la producción de proteínas recombinantes en células vegetales como biorreactores. En tal sentido, el autor menciona que las proteínas recombinantes adicionales, así como los metabolitos secundarios, tienen el mayor beneficio económico directo si se producen en un enfoque integrado. No obstante, pese a que las células vegetales ofrecen múltiples ventajas para la producción de proteínas recombinantes, su adopción por la industria se ve obstaculizada por el hecho de que los cultivos de células de mamíferos y otras están mucho más establecidos y mejor caracterizados en un entorno industrial, lo que dificulta que los procesos basados en plantas se afiancen. Por lo tanto, según Buyel [11] es necesario aprovechar el potencial adicional de los sistemas basados en células vegetales para utilizar los subproductos del proceso. Así pues, se ha demostrado que, en teoría, la integración de subproductos puede más que duplicar los ingresos del proceso en escalas industriales, aumentando la competitividad económica de los productos derivados del proceso.

Finalmente, en el 2020 Dhama et al. [38] investigaron el uso de células vegetales como plataforma potencial para producir vacunas y medicamentos antivirales para contrarrestar varios patógenos mortales importantes y emergentes como el SARS-CoV-2. Dichos productos farmacológicos se pueden producir en un período de tiempo corto de unas pocas semanas utilizando expresión transitoria en células vegetales. Dentro de estas, se pueden utilizar plantas de tabaco, legumbres o cereales, pues tienen la capacidad de cultivarse en diferentes condiciones ambientales; por lo tanto, pueden producirse productos como anticuerpos y medicamentos antivirales empleando infraestructuras regionales o locales. Asimismo, su producción es más económica que los fabricados mediante las principales metodologías de producción. El proyecto Pharma-Planta evaluó las directrices reglamentarias de la agricultura molecular para productos farmacéuticos de origen vegetal; tales principios prácticos pueden ayudar al desarrollo de vacunas y medicamentos [38]. En tal sentido, en la **Figura 3.1** se presenta una descripción general de la producción de vacunas a base de plantas en diferentes sistemas de expresión para combatir la COVID-19.

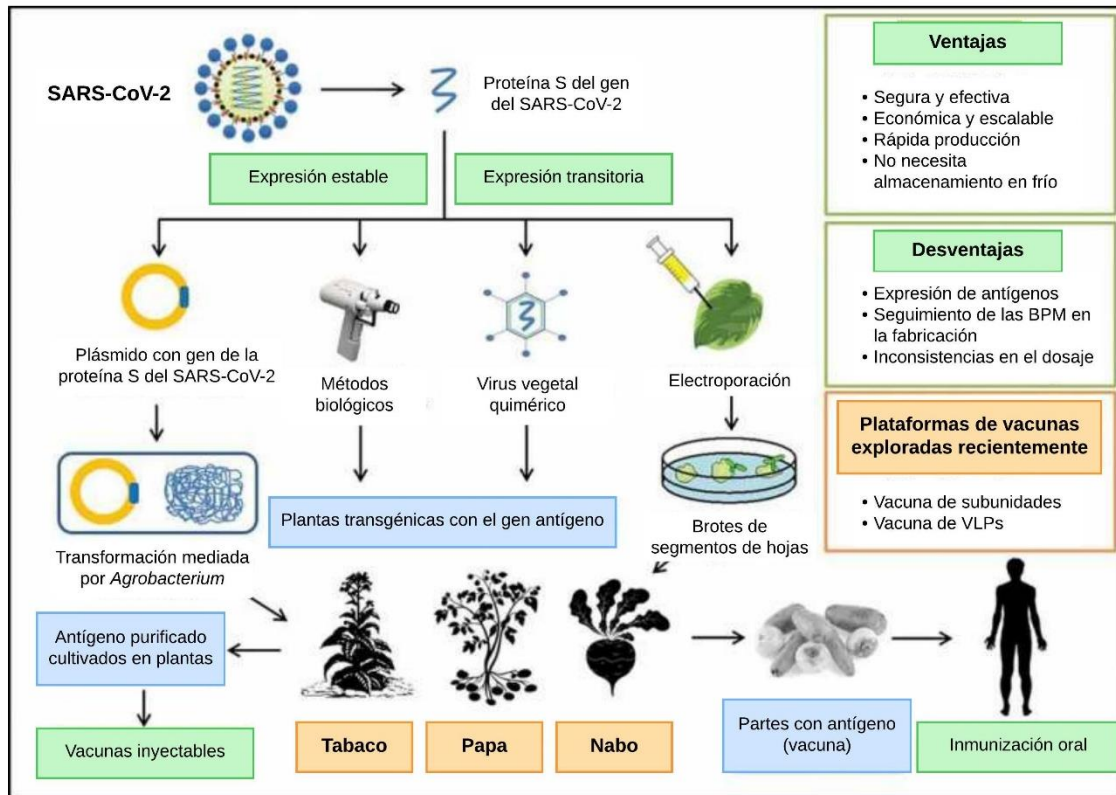


Figura 3.1. Representación de la producción de vacunas derivadas de células vegetales para combatir la COVID-19 en diferentes sistemas de expresión. Adaptado de [38].

Finalmente, Dhama et al. [38] mencionan que los desafíos que deben abordarse en el futuro son la selección de antígenos y la expresión de la planta huésped, la consistencia de la dosis y el seguimiento de los protocolos BPM para la producción. Esto, debido a que la toma de decisiones para elegir un sistema de producción de plantas es compleja y requiere análisis de costos específico, lo cual requiere la aplicación de varios criterios de evaluación para seleccionar el mejor sistema que coincida con las características del producto y permita una reducción general del costo de fabricación. Se debe considerar también el rendimiento de biomasa (g de proteína recombinante/g de biomasa) y estabilidad de almacenamiento, la selección de herramientas de purificación listas para usar, el costo de la disposición final de la biomasa (usada para la producción de las moléculas terapéuticas) y el potencial de manufactura de los subproductos para futuras investigaciones. Superar estas limitaciones

puede permitir la disponibilidad de vacunas vegetales seguras, efectivas, estables y asequibles en el futuro.

3.3. Procesamiento aguas abajo (*DSP*): estrategias de recuperación y purificación de proteínas.

Hasta el año 2000 los estudios en agricultura molecular se centraban exclusivamente en la productividad aguas arriba, aumentando los rendimientos en cuando al nivel de expresión (g de VLPs/g de biomasa) y la estabilidad de las proteínas [10]. Sin embargo, se prestó poca atención al procesamiento *downstream* y su escalabilidad. No obstante, en los últimos 10 años se han dado avances significativos, los cuales se presentan a continuación.

En el año 2011, Wilken et al. [39] mencionaron que el procesamiento *downstream* es la parte más cara de la producción de proteínas recombinantes y estima que representa hasta el 80% de los costes totales. Asimismo, acotaron que no solo la agricultura molecular, sino también los sistemas convencionales se enfrentan a dificultades técnicas que representan el cuello de botella del proceso. Para obtener un producto puro y homogéneo, la presencia de contaminantes debe eliminarse o reducirse a niveles mínimos aceptables. Por lo tanto, caracterizar la naturaleza del contaminante y demostrar el cumplimiento de las BPM son los principales desafíos de la purificación de células vegetales. De igual modo, [39] mencionan que en otras plataformas de producción de proteínas, como células de mamíferos o células bacterianas, se han desarrollado métodos poderosos para eliminar virus animales o endotoxinas. En el caso específico de los virus contaminantes provenientes del cultivo en organismos vegetales, no hay informes sobre la nocividad en humanos. En ese sentido, el riesgo no cuantificado en este tipo de sistemas de producción, es capaz de disminuir el desarrollo de las BPM en este tipo de procesos.

Posteriormente, Tusé et al. en el 2014 [40] investigaron la fase de purificación, la cual comienza con un paso de captura cromatográfica para concentrar la proteína recombinante y, lo que es más importante, eliminar las impurezas vegetales críticas (en un 95% de material que no reaccionó en la etapa *upstream*) que serían perjudiciales para el rendimiento, la calidad y/o la eficiencia de purificación de la proteína. Así pues, mencionan

también que para aplicaciones de alta pureza (terapéuticas y/o de diagnóstico que requieren una pureza mayor al 95%), normalmente se necesitan pasos de purificación adicionales con el propósito de eliminar las impurezas residuales (proteínas de la célula huésped - HCPs, lípidos, peptidoglicanos, etc) y garantizar una alta calidad del producto. En el caso específico de vacunas de VLPs, los procedimientos de purificación emplean técnicas similares a las ya desarrolladas para productos biofarmacéuticos como anticuerpos monoclonales (mAb), fragmentos de mAb, vacunas, citocinas y hormonas. No obstante, en la mayoría de casos, la purificación de proteínas recombinantes se basa principalmente en la cromatografía de adsorción debido a su poder de resolución superior y a la variedad de resinas disponibles (proteína A, proteína G, etc). Además, [40] acotan que el gran reto en el procesamiento *downstream* de vacunas en células vegetales es el costo de fabricación, el cual depende en gran medida de la expresión de proteínas, el rendimiento general del proceso y la escala de producción.

En una investigación realizada por Lojewska et al. 2016 [41] mencionan que años anteriores se han propuesto muchas estrategias para optimizar el procesamiento *downstream* utilizando materiales de menor costo o reduciendo el número de pasos de procesamiento. No obstante, los pasos básicos de este deben incluir como mínimo la recolección de tejido, la extracción de proteínas, la purificación y acabado con el propósito de maximizar la pureza del producto. Así pues, la extracción de proteínas es fundamental para definir su concentración y el volumen total de extracto. Por tal motivo, [41] menciona que los filtros sensibles y los aparatos de cromatografía requieren un extracto de alta pureza y se sugiere que el sobrenadante del cultivo celular y el medio hidropónico pasen por un proceso de clarificación previamente a la purificación.

La purificación de las proteínas, por lo general se constituye por una serie de pasos de cromatografía secuenciales, pero también pueden anteceder varios métodos de pretratamiento (por ejemplo, filtración por membrana y precipitación) solos o para mejorar el rendimiento de la cromatografía [42]. No obstante, [42] sugieren que la purificación no tenga más de tres pasos de procesamiento. Así pues, pese a que la cromatografía es el método preferido en la mayoría de las purificaciones de proteínas recombinantes, todavía se siguen

realizando estudios de secuenciamiento de etapas que permitan la reducción del número de pasos.

Luego de la revisión del estado del arte del DSP, se revisarán los avances específicos en cada una de las etapas del procesamiento *downstream* de las vacunas de VLPs en células vegetales.

3.3.1. Extracción.

En el año 2015, Buyel et al.[21] condujeron una investigación acerca del método más adecuado para la extracción de proteínas en células vegetales. En esta investigación, se mencionó que la extracción se realiza mediante la adición de una solución *buffer* para facilitar la recuperación de la proteína diana u objetivo estabilizando el pH a un valor deseable (7 a 8), proporcionando salinidad suficiente para mantener la solubilidad del producto y proporcionando antioxidantes para prevenir modificaciones proteicas no deseadas. Un valor pH entre 4.0 y 5.0 puede ser preferible si la molécula diana es estable en estas condiciones porque algunos contaminantes precipitan o quedan excluidos del extracto en estas condiciones, lo que facilita la purificación. Asimismo, el estudio menciona que se pueden utilizar otras estrategias de pre-acondicionamiento, como el escaldado o la precipitación con calor a ~65-70 ° C, para reducir la concentración de las células huésped de la planta en un 90% al principio del proceso si las proteínas diana son termoestables. Finalmente, Buyel et al. [21] concluyen que los *buffer* acuosos son los aditivos más comunes porque son más compatibles con la estructura y la actividad proteica; no obstante, también se pueden utilizar fluidos supercríticos como el CO₂ e incrementar la recuperación de producto entre 2 y 3 veces.

En el año 2016, Lojewska et al. [41] concluyeron que el método de extracción depende principalmente del tipo de expresión en las células vegetales y, normalmente, incluye la recolección de la planta y la maceración de tejidos. Las semillas molidas o la biomasa de hojas se pueden homogeneizar mediante homogeneizadores a base de prensa o cuchillas. Para facilitar la recuperación de proteínas, comúnmente se agrega una solución tampón a la biomasa recibida, cuyas funciones son proporcionar pH y salinidad adecuados,

adicionar antioxidantes y mantener la solubilidad. El tipo de solución *buffer* depende del tipo de proteína extraída, pero el más usado para partículas virales es el de fosfato de potasio y el cloruro de sodio a 4°C. Por otro lado, otro método mecánico de extracción conocido como centrifugación por infiltración al vacío se utiliza para obtener productos extracelulares. Este método de dos pasos implica esencialmente el reemplazo del espacio de aire con un fluido de infiltración acuoso, seguido de la recuperación de la mezcla de fluido de infiltración por medio de un lavado suave el cual puede reducir potencialmente los costes del procesamiento posterior, ya que la recuperación se logra sin homogeneización de todo el tejido según [41]. No obstante, la liberación de proteínas y contaminantes (por ejemplo, enzimas proteolíticas, que pueden destruir el producto) es el principal obstáculo durante la maceración de tejidos.

Finalmente, [43] realiza un estudio de extracción combinada y separación sólido-líquido de proteínas. Así pues, los autores mencionan que esta extracción puede reemplazar la homogeneización y la filtración inicial de la biomasa de las células vegetales. La biomasa se alimenta a un exprimidor o prensa de tornillo que contiene un cilindro giratorio cónico con un orificio que se estrecha progresivamente, por lo que se extrae el producto de la planta de la biomasa aumentando constantemente la presión. Este método se ha utilizado para recuperar pequeñas moléculas de la biomasa vegetal [43], asimismo, este se ha adaptado para extraer anticuerpos y otras proteínas de la biomasa de células vegetales sin utilizar soluciones *buffer*. Aunque esto redujo la recuperación en un 40-65%, las concentraciones de proteína aumentaron 2.8 veces y el volumen de proceso se redujo 5 veces, lo que es deseable para DSP por la reducción de costos en comparación a sistemas convencionales.

3.3.2. Clarificación.

En lo que respecta a la clarificación Lojewska et al. [41] realizaron un estudio recomendando algunos métodos de acuerdo a sus ventajas y desventajas. La ruptura del tejido vegetal contamina en gran medida el extracto de proteína al liberar la carga de partículas. Estas impurezas suelen incluir ADN y ARN de plantas, alcaloides, polisacáridos, clorofila y proteínas solubles. Además, la presencia de polifenoles en el extracto de plantas no es conveniente para la purificación eficiente de proteínas, porque pueden causar cambios conformacionales y estructurales en las proteínas y formar agregados de polifenoles-proteína.

La eliminación preliminar de polifenoles mejora de manera importante las tasas de microfiltración. Los filtros sensibles y los aparatos de cromatografía requieren un extracto de alta pureza (mayor al 80%); por lo tanto, el contenido de sólidos suspendidos del cultivo celular debe reducirse antes del proceso de purificación. Por lo que, los autores recomiendan a la filtración en serie como un método más fácil de escalar, aunque la capacidad del filtro es crucial para una producción eficaz.

Por otro lado, Twyman et al. [44] estudia a dos de las operaciones unitarias más comunes en la clarificación (centrifugación y filtración). La centrifugación puede ser difícil de escalar debido a los cambios en la geometría del aparato y puede ser necesario reducir el caudal en más del 50% para mantener la capacidad de clarificación o el área de sedimentación. Por lo tanto, se prefieren las combinaciones de centrífugas y filtros para la clarificación de extractos de plantas porque también pueden eliminar pigmentos y ADN. Sin embargo, el filtro debe elegirse con cuidado porque los productos proteicos pueden adsorberse en la diatomita contenida en la mayoría de los filtros. La combinación óptima de filtros en términos de capacidad, clarificación y recuperación del producto debe determinarse experimentalmente para cada proceso dependiendo de la distribución del tamaño de partículas, p. ej. utilizando filtros de mangas, filtros de profundidad y / o filtro de prerrevestimiento. Asimismo, en esta investigación se concluyó que la floculación aumenta la capacidad del filtro de profundidad durante la clarificación de extractos de plantas en un factor de cinco, lo que reduce el costo de los filtros en consecuencia. Sin embargo, implementar la floculación a escala de proceso también introduce costos adicionales que no son evidentes a escala de laboratorio (por ejemplo, un tanque de retención adicional para acomodar el proceso de floculación, que como consecuencia se vuelve discontinuo o semicontinuo en el mejor de los casos si el proceso se cicla entre varios tanques). Además, se requiere que las bombas agreguen el floculante, que debe ser de grado farmacéutico en términos de pureza y debe mantenerse con un inventario suficiente. Finalmente, el floculante puede interferir con los pasos posteriores de la cromatografía en la purificación, que requieran controles de calidad adecuados para demostrar que el floculante no está presente en la formulación final de las VLPs.

3.3.3. Purificación.

La purificación de proteínas recombinantes se basa principalmente en la cromatografía de adsorción debido a su poder de resolución superior y la variedad de resinas disponibles. No obstante, hay muy pocos estudios que reporten procesos de purificación de proteínas recombinantes de origen vegetal que hayan llegado a ensayos clínicos o escala piloto. Un ejemplo que Wilken et al. [39] mencionan es la purificación de anticuerpo monoclonal (como ejemplo de proteína de interés) a partir del extracto de tabaco. El extracto de tabaco clarificado se acondicionó primero con sulfato de amonio al 25% para eliminar las impurezas del extracto que interfieren y luego se concentró por precipitación con sulfato de amonio al 50%. El sedimento solubilizado se purificó usando una resina cromatográfica de proteína A, seguido de una etapa de intercambio aniónico débil. A una escala de 5 kg de biomasa en esta etapa, la pureza fue del 95% con un rendimiento del 49% (cantidad de biomasa o producto formado por la cantidad de sustrato consumido), lo cual resultó ser positivo para el proceso de purificación de tres pasos.

En el año 2012, Mahajan et al. [45] mencionan en su estudio que la cromatografía de afinidad de proteína A se usa ampliamente para la purificación de proteínas recombinantes logrando buenos resultados en cuanto a la purificación. En la escala de fabricación, el flujo a purificar se carga típicamente en una sola columna de cromatografía de afinidad de *proteína A* en ciclos hasta que se termina de procesar todo el flujo. No obstante, los costes de la resina de *proteína A* son significativos y comprenden una parte sustancial de los costes de las materias primas en la fabricación de proteínas recombinantes. En el estudio de Mahajan et al. se realizaron una serie de experimentos utilizando tres columnas según el principio de cromatografía periódica en contracorriente de tres columnas (3C-PCC). Las columnas se cargaron individualmente en diferentes momentos hasta que se alcanzó el punto de ruptura del 70%. Posterior a ello, se cargó el flujo con proteína libre al siguiente paso con el propósito de capturar a la proteína de interés evitando cualquier pérdida de esta. En todo el ciclo de operación, las tres columnas están en funcionamiento, ya sea cargando o lavando, lo que permitió una reducción del tiempo de procesamiento en un 30%. El rendimiento y la calidad del producto se evaluaron y compararon con un proceso por lotes para determinar el efecto

de utilizar el proceso continuo de tres columnas. La operación continua muestra el potencial de reducir tanto el volumen de resina como el consumo de solución *buffer* en aproximadamente un 40%; sin embargo, el nivel de complejidad del sistema resulta ser mayor en comparación al proceso por lotes. También se evaluaron métodos alternativos que utilizan una sola columna de afinidad estándar, como reciclar el efluente de la carga de regreso a un tanque de almacenamiento o aumentar el tiempo de residencia con un movimiento molecular lento dentro de la fase estacionaria, para mejorar la eficiencia de la resina de la *proteína A*. Estos métodos alternativos mostraron beneficios de costos de capital similares, pero requirieron un tiempo de procesamiento más largo, en lo que respecta a esta operación unitaria.

Wilken et al. [39] concluyeron en un estudio que es recomendable que la fase de purificación comience con un paso de captura para concentrar la proteína recombinante y, lo que es más importante, eliminar las impurezas vegetales críticas que serían perjudiciales para el rendimiento, la calidad y / o la eficiencia de la purificación de la proteína. La purificación de proteínas recombinantes producidas en células vegetales, de manera similar a otros sistemas de producción de proteínas, depende de las propiedades y de las impurezas de la célula huésped, y utiliza estrategias similares para el desarrollo de la purificación como otros sistemas de expresión heterólogos, los cuales ofrecen la posibilidad de identificar genes de interés que no logran ser expresados por ellos mismos [39].

En el año 2015, Zischewski et al.[46] mencionan que la purificación de VLPs generalmente implica un paso de captura inicial utilizando una resina de *proteína A*. Los autores enfatizan la importancia de las etapas de pretratamiento y acondicionamiento para eliminar proteasas, en el contexto de la durabilidad de la resina, debido a que las de *proteína A* son uno de los mayores costos de inversión de capital, es decir, ~ \$ 11 millones para la producción de 10 toneladas de VLPs utilizando células vegetales. Alternativamente, se puede integrar un paso de ultrafiltración / diafiltración (UF/DF) antes de la cromatografía en columna de *proteína A* para reducir el volumen de la corriente del proceso y acelerar la recuperación del producto, especialmente si las concentraciones son más altas (por ejemplo, $> 0.6 \text{ g L}^{-1}$). Los pasos de pulido que siguen al paso de captura son similares para todas las

plataformas de biomanufactura, y normalmente implican cromatografía de intercambio iónico o de interacción hidrofóbica.

Finalmente, en el Anexo 4 se mencionan las ventajas y desventajas de las operaciones de procesamiento aguas abajo para la producción de VLPs a gran escala como resumen del estado del arte mencionado en la presente sección.

3.4. Seguridad y regulaciones en el desarrollo de vacunas.

En los últimos años, se ha venido estudiando ampliamente el uso de las llamadas plataformas de próxima generación para el desarrollo de vacunas. Entre las tecnologías exitosas se encuentran las plataformas de producción para vacunas basadas en tecnologías de ADN y ARN, así como vacunas de vectores virales de particular interés en la pandemia de la COVID-19 [47]. Así pues, las directrices sobre el desarrollo, producción y control de calidad de productos biofarmacéuticos son publicadas, actualizadas y fiscalizadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y, a nivel mundial, por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [7].

Por otro lado, actualmente se encuentra disponible una lista de documentos de la OMS relacionados con el desarrollo y la evaluación de vacunas contra el SARS-CoV-2 y otros productos biológicos [35]. No obstante, una preocupación importante con respecto a la seguridad de tales productos es la posible presencia de microorganismos contaminantes de cultivos celulares o materias primas utilizadas en la producción que podrían ingresar al producto. Las recomendaciones detalladas para la evaluación de cultivos de células animales como sustratos para la fabricación de productos biológicos, para la caracterización de bancos de células y para el control de las materias primas utilizadas en la producción están disponibles en la OMS [9], el Consejo Internacional de Armonización (ICH) [10] y en las entidades reguladoras nacionales como DIGEMID [48].

Finalmente, en el caso específico de vacunas derivadas de células vegetales y el uso de la tecnología de agricultura molecular, existen controles para evitar riesgos económicos resultantes para los agricultores y la industria alimentaria, como transgenes diseminados por

polen, semillas o dispersión de frutos y la dispersión no intencionada o exposiciones a organismos no objetivo lo que, se están desarrollando varias regulaciones, para aumentar la bioseguridad del uso de células vegetales como biorreactores. Sin embargo, según la FDA, la aplicación de la normativa aún presenta vacíos legales, al ser difícil monitorear todas las diferentes etapas de desarrollo y procesamiento de los productos derivados de células vegetales. No obstante, gracias al desarrollo de procesos con este tipo de sistema de producción aguas arriba, se espera una mayor presencia de las agencias reguladoras en los siguientes años gracias a los resultados prometedores obtenidos hasta la fecha [14].

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

El presente capítulo presenta las técnicas y métodos para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados en el capítulo I. En la **Figura 4.1**, se observa la estructura del desarrollo del proyecto en un diagrama de flujo general. Asimismo, en cada sección del capítulo se presentan los parámetros que se consideraron para el modelamiento matemático de cada etapa. Cabe destacar que, como la investigación acerca de la producción de vacunas de VLP en base de la planta *Nicotiana benthamiana* se centra en el proceso aguas abajo, estas etapas serán descritas con mayor detalle.

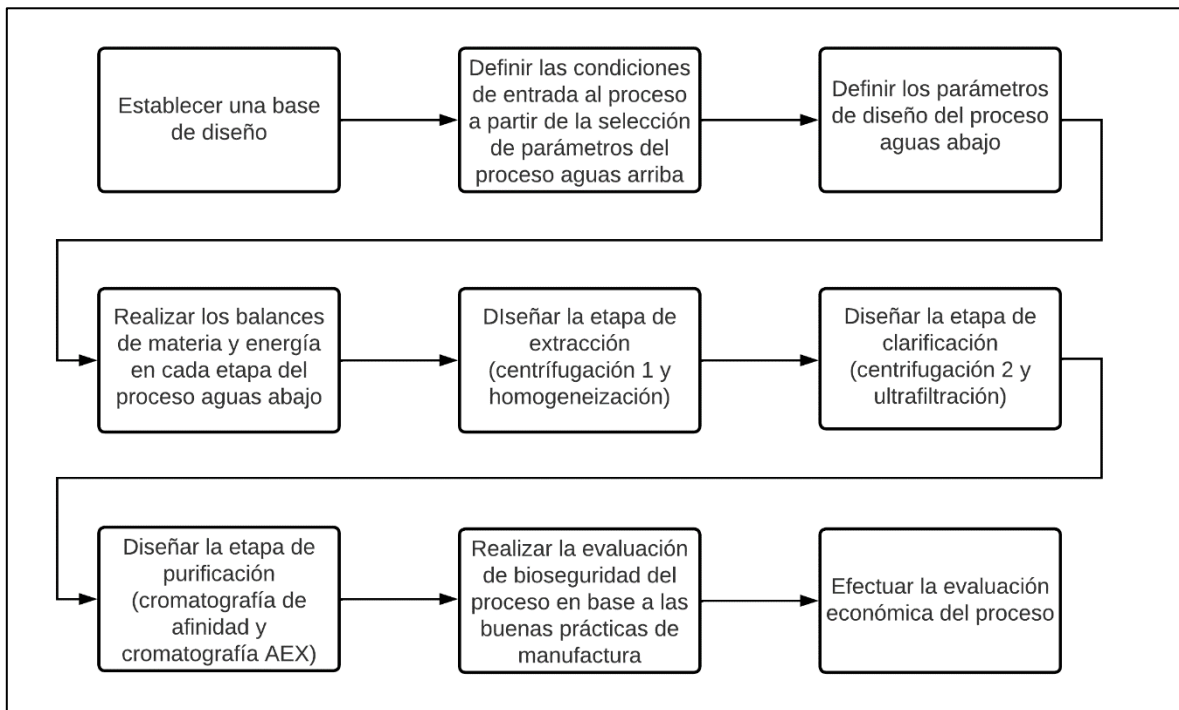


Figura 4.1. Diagrama de flujo para el desarrollo de la metodología del proyecto de investigación.

4.1. Establecimiento de la base de diseño.

El diseño del proceso inicia con el establecimiento de las especificaciones y restricciones en relación a la calidad del producto (vacuna VLPs), determinadas a partir de datos de la literatura como se presenta en la **Tabla 4.1**. Además, se estableció la capacidad de producción a partir de recientes investigaciones de la producción de vacunas de VLPs contra la COVID-19 en unidades de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de biomasa [49].

Parámetro de especificación del producto	Metodología a emplear para su determinación
Vía de administración de la dosis	Inyectable en viales. Criterio ya definido en base a la selección de etapas en el estado del arte, pues no se toma en cuenta una etapa de liofilización por el nivel de expresión de las proteínas en biomasa.
Concentración por dosis	3.75 $\mu\text{g/dosis}$ en base a ensayos clínicos reportados en [50].
Temperatura de almacenamiento	Al no tener presencia de material genético en los VLPs, no se requerirán temperaturas muy bajas (menor a los 0°C) [51]. El rango de valores ($5-15^{\circ}\text{C}$) se determinó en base a las tecnologías utilizadas en las etapas de purificación y concentración.
Impurezas que afecten la estabilidad de la vacuna	Se determinaron en base al balance de materia en la última etapa de purificación, teniendo en cuenta las restricciones acerca de la pureza del producto final dictadas por agencias internacionales para la producción de vacunas ($<5\%$).

Tabla 4.1. Parámetros a considerar para la especificación del producto.

4.2. Construcción del BFD.

Luego del establecimiento de la base de diseño, fue necesario construir un diagrama de flujo de bloques (BFD) para comprender la estructura básica del proceso propuesto. Cabe destacar que, el proceso aguas arriba será incluido en la construcción del BFD con el propósito de representar el proceso general. Sin embargo, no se realizaron cálculos de dimensionamiento de estas etapas, pues se trata de la tecnología de agricultura molecular, la que involucra pruebas en laboratorio para expresar el gen viral antígeno en *Nicotiana benthamiana*, cuyo tema no está directamente relacionado con la ingeniería química.

4.3. Selección de parámetros del proceso aguas arriba.

La búsqueda y establecimiento de los parámetros y condiciones en el proceso aguas arriba (plataforma de producción) son necesarios para la definición de las corrientes de entrada a las etapas de extracción. Por lo cual, se recurrió a la literatura para la conceptualización de la síntesis, ya que son etapas realizadas a escala laboratorio en un proceso estándar llamado selección de plataforma de producción y *molecular farming* como se presentó en la **Figura 2.2** de la sección 2.2 del marco teórico.

En cuanto a la selección de parámetros del proceso aguas arriba que se consideraron son la temperatura, la humedad relativa y el tiempo de crecimiento de las plantas (etapa de incubación) de acuerdo a Menzel et al. [52].

4.4. Definición de parámetros del proceso aguas abajo.

En esta sección, se define la línea base en relación a los parámetros necesarios para el posterior cálculo de diseño de los equipos correspondientes a las operaciones unitarias del diagrama de bloques del proceso. Los valores de dichos parámetros serán extraídos de la revisión bibliográfica actualizada [11].

4.4.1. Extracción.

La primera etapa del proceso *downstream* es la extracción, donde se utiliza una centrífuga de discos y un homogeneizador de alta presión. Así pues, parámetros como el pH, la temperatura y el tipo de solución *buffer* son de importancia para el diseño de estas operaciones como se presenta en la **Tabla 4.2** según la referencia [53].

Parámetros	Valores recomendados
Cantidad de biomasa	600 kg de biomasa/semana. (parámetro definido según la capacidad de diseño y el nivel de expresión de VLPs en <i>Nicotiana benthamiana</i>)
Temperatura	4-20°C
Velocidad de agitación	3000-3600 rpm
Solución <i>buffer</i> a utilizar	<i>Buffer</i> fosfato salino (8M urea, 50 mM NaCl, 20 mM Bis-tris propane, pH 7.0)
Volumen de solución <i>buffer</i>	Dependiente de la cantidad de biomasa a tratar, pero se recomienda 3 L.kg ⁻¹ con una viscosidad de 0.005 kg/m.s

Tabla 4.2. Parámetros referenciales para la extracción [41].

4.4.2. Clarificación

La clarificación del proceso inicia con la centrifugación, donde se tiene en consideración el volumen en el proceso, la máxima velocidad de rotación y las fuerzas gravitacionales [54]. Seguidamente, se realiza una ultrafiltración (UF) empleando como técnica a la filtración de flujo tangencial (TFF, por su nombre en inglés *tangential flow filtration*), también conocida como filtración de flujo cruzado. La capacidad del filtro continuo se definirá como resultado de los balances de masas. Cabe destacar que, las

variables de control son la turbidez, el pH y la conductividad y que será necesario definir la eficiencia de los equipos, para obtener un producto clarificado con un máximo de 15% de biomasa residual suspendida según lo recomendado por [21].

4.4.3. Purificación

Para la etapa de purificación, se aplican columnas de cromatografía de afinidad (AC), donde el efluente de la etapa de ultrafiltración de VLPs es sometido a este proceso para remover toda molécula contaminante residual que no sea afín con el ligando, recuperando el producto en una columna de *proteína A* inmovilizada mediante la adsorción. En secuencia, serán utilizadas dos etapas consecutivas de cromatografía de intercambio aniónico (AEX). A continuación, se presenta la **Tabla 4.3.** en la que se establecerán los parámetros recomendados en las corrientes circulantes en los equipos mencionados para el diseño a base de modelos matemáticos [55].

	AC	AEX
Temperatura	30-50°C	35-65°C
Solución <i>buffer</i>	Depende del pH (6.5)	Depende del pH (8.0)
Velocidad lineal	Dependiente de las curvas de ruptura con el fin de analizar la influencia de esta variable en la productividad.	60 cm/h

Tabla 4.3. Parámetros definidos para las etapas de purificación [52].

4.4.4. Concentración y acabado.

En secuencia, para la concentración de la muestra purificada, se plantea una etapa de diafiltración (DF). Posteriormente, se estudiará una microfiltración de membranas para el término de esta etapa. En la **Tabla 4.4,** se presentan parámetros recomendados para ambos equipos, los cuales serán de interés para los balances de masa y energía, así como para el modelamiento de cada uno de estos.

	UF/DF	Filtración estéril
Solución <i>buffer</i>	Borato de sodio 10 mM preparado a partir de tetraborato de sodio	No aplicable a esta etapa
pH de la solución <i>buffer</i>	5-6	6.5-7
Tamaño de poro	No aplicable a esta etapa	0.1 – 20 μm
Tipo de operación	Por lotes	Por lotes
Material de la membrana	No aplicable a esta etapa	Alúmina

Tabla 4.4. Parámetros definidos para la concentración [52].

Finalmente, cabe destacar que, para el desarrollo de la investigación, solo se definirán parámetros base de diseño para los equipos propuestos de concentración y acabado, pues estas etapas son dependientes de la concentración de sólidos y la pureza luego de la etapa de purificación del producto.

4.5. Balances de materia y energía.

En la **Figura 4.2**, se observa la secuencia de procedimientos para realizar el balance de masa y energía. Para la resolución de las ecuaciones correspondientes a los balances de masa y energía de cada equipo, se utilizaron herramientas de modelado y simulación detalladas en la siguiente sección.

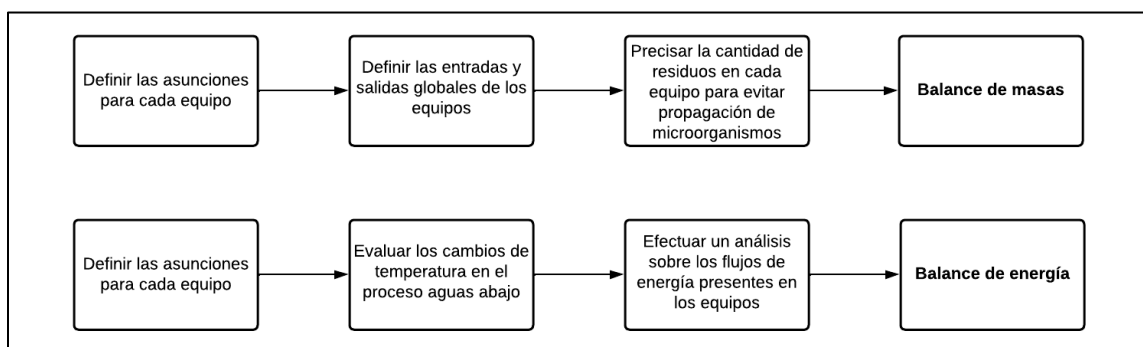


Figura 4.2. Diagrama de flujo para el desarrollo del balance de masas y de energía de cada uno de los equipos.

4.6. Software de simulación.

Para el dimensionamiento de los equipos de cromatografía se realizó un modelamiento matemático empleando ecuaciones diferenciales y se tomó como base los balances de materia y energía en cada etapa propuesta del proceso. Así pues, estas serán resueltas utilizando el software *Matlab* con el *toolkit* para la etapa de cromatografía líquida llamado CADET, el cual permite la realización de una simulación directa comprendida en cuatro pasos (carga, captura, lavado y regeneración) [56].

4.7. Diseño de equipos del procesamiento aguas abajo.

4.7.1. Diseño de la unidad de extracción.

La etapa de extracción, empieza con una centrífuga de discos, donde se determina el factor sigma y el máximo flujo volumétrico permitido. No se consideran necesarios cálculos del diámetro mínimo de partícula en la centrífuga, ya que en esta etapa se busca remover la mayor cantidad de sólidos de tamaño mayor a $0.15 \mu\text{m}$ antes de la homogeneización. Posterior a ello, se propuso un homogeneizador de alta presión a base de cuchillas en un intervalo de entre 50-60 MPa como lo sugiere Buyel et al. [53], referencia en la que se presentan las ecuaciones para su modelamiento, y consecuente dimensionamiento. En ese sentido, se definen los parámetros organizados en la **Tabla 4.5**.

Parámetro	Definición
R [M/L ³]	Concentración de proteína liberada (células rotas) después de N pasos.
R_m [M/L ³]	Concentración máxima de proteína que puede ser liberada.
N	Número de pasos a través de la válvula del homogeneizador.
k' (1/pasos)	Constante cinética de primer orden.

Tabla 4.5. Definición de variables a utilizar en el diseño de homogeneización de alta presión [57].

La desintegración celular en un homogeneizador de alta presión puede ser descrita mediante una cinética de primer orden con la ecuación 1.

$$\frac{dR}{dN} = k'(R_m - R) \quad (Ec. 1)$$

La ecuación anterior permite que se pueda integrar bajo las siguientes condiciones de frontera:

$$N = 0 \quad R = 0 \quad (Ec. 2)$$

$$N = N \quad R = R \quad (Ec. 3)$$

De modo que, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k'N \quad (Ec. 4)$$

Por otro lado, debido a que experimentalmente se ha determinado que la constante cinética (k') depende de la presión en el homogeneizador.

$$k' = k''P^a \quad (Ec. 5)$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (4) y (5) obtenemos una expresión que modela el proceso del rompimiento celular, el cual no depende de la concentración celular, como se muestra a continuación

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = k''P^a N^b \quad (Ec. 6)$$

donde a es una constante que depende de los rangos de los intervalos de presión y b es un exponente que varía con el tipo de célula.

4.7.2. Diseño de los equipos de la etapa clarificación.

La operación de centrifugación da inicio a la etapa de clarificación, así las ecuaciones que describen el funcionamiento de la centrífuga de tipo disco se basan en la fuerza de flotación de las partículas y la ley de Stokes [58]. A continuación, se presenta una ecuación para analizar el diámetro mínimo que puede separar la centrífuga en mención.

$$d_{min} = \sqrt{\frac{18Q\mu_L}{A(\rho_s - \rho_L)g}} \quad (Ec.7)$$

La ecuación 4.7 puede ser ajustada teniendo en cuenta los parámetros de diseño del proceso, los cuales se muestran en la **Tabla 4.6** tomando como referencia a L. Shekhawat et al. [58]. Cabe destacar que, en el caso de los parámetros calculados son los provenientes de etapas anteriores, mientras que los parámetros a calcular son los que se evaluarán en la etapa en mención.

	Parámetro	Definición
Parámetros calculados	$Q \left(\frac{m^3}{s} \right)$	Flujo volumétrico
Parámetros de la bibliografía	$\mu_L (Pa \cdot s)$	Viscosidad del líquido
	$A (m^2)$	Área transversal de la centrífuga
	$\rho_s \left(\frac{kg}{m^3} \right)$	Densidad del sólido
	$\rho_L \left(\frac{kg}{m^3} \right)$	Densidad del líquido
	$g \left(\frac{m}{s^2} \right)$	Aceleración de la gravedad
	$\omega \left(\frac{rad}{s} \right)$	Velocidad angular
	n	Número de discos de la centrífuga
	$r_0 (m)$	Radio exterior del disco
	$r_i (m)$	Radio interior del disco

	$\theta(^{\circ})$	Ángulo del disco
Parámetro a calcular	$d_{min}(m)$	Diámetro mínimo de la centrífuga

Tabla 4.6. Parámetros para el diseño de una centrífuga de disco.

Posteriormente, se considerará a la etapa de ultrafiltración por lotes, donde el volumen y la concentración inicial de la solución (V_0 y C_{B0}) se procesan hasta alcanzar los resultados del estado final de estos parámetros (V_f y C_{Bf}), teniendo finalmente al volumen de permeado (V_P). Un balance de soluto en el sistema, considerando la concentración de soluto en el permeado (C_P) constante, se puede expresar como:

$$\frac{d}{dt}(VC_B) = C_P \frac{dV}{dt} \quad (Ec. 8)$$

Ahora, la ecuación anterior se integra entre los límites ($V=V_0$ y $C_B=C_{B0}$) y ($V=V$ y $C_B=C_B$), obteniendo como resultado la siguiente expresión:

$$V = V_0 \exp \left[- \int_{C_{B0}}^{C_B} \frac{dC_B}{(C_B - C_P)} \right] \quad (Ec. 9)$$

Posteriormente, considerando también la expresión que modela al flux.

$$J = - \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (Ec. 10)$$

Donde A es el área de ultrafiltración la cual puede ser integrada entre 0 y t y expresada con ayuda de la ecuación (4.10) de la siguiente manera.

$$\frac{At}{V_0} = \int_{C_{B0}}^{C_{Bf}} \frac{\exp \left[- \int_{C_{B0}}^{C_B} \frac{dC_B}{(C_B - C_P)} \right]}{J(C_B - C_P)} \quad (Ec. 11)$$

Y, cuando la retención es total y $C_P=0$, la ecuación (11) se puede simplificar como la siguiente expresión que puede ser utilizada para calcular el área necesaria para realizar la operación de ultrafiltración.

$$\frac{At}{V_0} = C_{B0} \int_{\frac{1}{C_{Bf}}}^{\frac{1}{C_{B0}}} \frac{1}{J} d\left(\frac{1}{C_B}\right) \quad (Ec. 12)$$

La definición de parámetros utilizados en las ecuaciones mostradas anteriormente se muestra en la **Tabla 4.7**.

Parámetro	Definición
V_0	Volumen inicial de la solución (L)
C_{B0}	Concentración inicial de la solución (g/L)
C_P	Concentración del permeado (g/L)
J	Flux de permeado (L/m ² -h)
A	Área de ultrafiltración (m ²)

Tabla 4.7. Parámetros de las ecuaciones presentadas para las etapas de microfiltración/ultrafiltración.

Además de las ecuaciones presentadas, para el dimensionamiento de los equipos de la clarificación, se consideraron el perfil de impurezas, y la relación entre el rendimiento de los equipos y el coeficiente de rechazo como lo propone [59].

4.7.3. Diseño de los equipos de la etapa de purificación.

Para el dimensionamiento de los equipos de la etapa de purificación se estudiará un arreglo de columnas cromatográficas de afinidad (AC). Las ecuaciones diferenciales que describen la transferencia de masa en las columnas son mostradas en las ecuaciones matemáticas (13) y (14).

$$\frac{\partial C_L}{\partial t} = D_{AX} \frac{\partial^2 C_L}{\partial x^2} - \frac{\partial C_L}{\partial z} - \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \frac{3k_f}{r_p} (C_L - C_P) \quad (Ec. 13)$$

$$\frac{\partial C_L}{\partial t} = D_P \left(\frac{\partial^2 C_P}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_P}{\partial r} \right) - \frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \frac{\partial q}{\partial t} \quad (Ec. 14)$$

En la **Tabla 4.8.** se muestra la definición de los parámetros empleados en las ecuaciones presentadas.

C_L (mg L⁻¹)	Concentración del adsorbato
D_{AX} (m²/min)	Coefficiente de dispersión axial
C_P (mg L⁻¹)	Concentración de la superficie
k_f	Coefficiente de transferencia de masa de la película
ϵ_p	Porosidad de la partícula
D_p	Difusión de poro
r_p (m)	Radio de la partícula
k_{ADS}	Coefficiente de adsorción
q_m (mg L⁻¹)	Concentración de adsorción máxima
k_{DES}	Coefficiente de desorción
C_{pi}^*	Concentración de proteína
m	Número de moles
P_c	Productividad
q (mg L⁻¹)	Concentración de adsorción en perlas
L_t (mg L⁻¹)	Concentración de los sitios que interactúan con las proteínas
n	Sitios de unión en las proteínas
σ	Factor estérico de las proteínas
K_s (mmol.L⁻¹)	Constante de equilibrio de la sal
K_a (mmol.L⁻¹)	Constante de equilibrio para el proceso de intercambio iónico
t_{ciclo} (min)	Tiempo de ciclo
t_c (min)	Tiempo de alimentación interconectado
V_B (L)	Volumen de lecho de una columna

Tabla 4.8. Parámetros de las ecuaciones presentadas en el diseño de los equipos de purificación.

Luego, para describir la cinética de adsorción se plantea un modelo de adsorción-desorción del tipo Langmuir descrito en [60].

$$-r_p = \frac{\partial q}{\partial t} = k_{ADS} \times C_P \times (q_m - q) - k_{DES} \times q \quad (Ec. 15)$$

Posteriormente, para describir la adsorción de proteínas utilizadas en la cinética en base a isothermas de la cromatografía de afinidad se utilizará la siguiente ecuación:

$$C_{pi}^* = K_{a,i} \left[\frac{L_t - \sum_{i=1}^N (n_i + \sigma_i + K_S C_S^a \sigma_i) \times C_{pi}^*}{1 + K_S C_S^a} \right]^{n_i} \quad (Ec. 16)$$

Asimismo, para encontrar el número de moles, el tiempo de alimentación interconectado, el tiempo de ciclo y la productividad se tienen las siguientes ecuaciones:

$$m = Q \int_{t=0}^{t=1s} [c_0 - c(t)dt] \quad (Ec. 17)$$

$$t_c = \frac{m}{c_0 Q} - t_{CW} \quad (Ec. 18)$$

$$t_{ciclo} = 3(\max(t_c, t_{RR}) + t_{CW}) \quad (Ec. 19)$$

$$P_c = \frac{3m}{3V_B t_{ciclo}} \quad (Ec. 20)$$

Ahora bien, en el caso de las columnas cromatográficas en arreglo de 3 pasos, en el primer paso, las dos columnas de afinidad están interconectadas. La primera columna se carga más allá de su capacidad de avance dinámico, seguido de un lavado con *solución buffer* para transferir el producto no unido de la primera columna a la segunda columna. En el segundo paso, las dos columnas de afinidad funcionan en paralelo como columnas individuales. Mientras la primera columna (sobrecargada) se lava, eluye, limpia y reequilibra, la segunda columna continúa cargándose hasta que alcanza el 1 % de avance. El caudal de carga de la segunda columna puede reducirse para sincronizarse con la recuperación y regeneración de la primera columna. En el tercer paso, la primera y segunda columna se interconectan y cargan en serie de manera análoga al primer paso. En el cuarto paso, la

segunda columna se lava, eluye, limpia y reequilibra mientras continúa la carga en la primera columna. Una vez que se completa un ciclo, el proceso puede continuar hasta que se decida no cargar la primera columna. Una fase interconectada con carga adicional (que se calcula con base en el conocimiento de la curva de ruptura del producto) inicia el proceso de estado estacionario cíclico, teniendo en cuenta que las columnas están inicialmente desprovistas de producto. Cuando se detiene el proceso, la primera columna se lava, eluye, limpia y reequilibra mientras que la segunda permanece inactiva (porque se limpió y reequilibró en el paso anterior).

Finalmente, cabe destacar que, con las ecuaciones descritas se obtendrá la cinética de adsorción y la concentración de los VLPs en función del tiempo, lo que se utilizará para el dimensionamiento de los equipos del proceso en base a los balances de materia y energía. Los cálculos serán realizados utilizando una hoja de cálculo en MS Excel y MATLAB para resolver las ecuaciones diferenciales que son dependientes del tiempo de cada operación.

4.7.4. Diseño de equipos auxiliares.

Luego del diseño de los equipos principales del proceso, se dimensionaron los equipos auxiliares como bombas, intercambiadores de calor o tanques de almacenamiento. En el caso de las válvulas, se seleccionará el tipo, el modo de acción y el tamaño de cada una de estas de acuerdo a los catálogos disponibles.

4.8. Construcción del PFD.

Posterior al dimensionamiento de los equipos del proceso, se construyó un PFD, donde se tomó como referencia la norma ISO 15519-1: 2010 [61], pues en esta se muestran reglas generales para la especificación de diagramas en la industria química.

4.9. Scheduling del proceso.

Posteriormente, se realizó el *scheduling* del proceso de manera secuencial con el propósito de determinar el tiempo destinado a la producción para un lote de vacunas de VLPs. Para ello, se empleó Microsoft Excel, para elaborar un diagrama de Gantt que muestre a detalle el tiempo de cada operación unitaria de la configuración propuesta.

4.10. Evaluación de la seguridad del proceso en base a las BPM.

La evaluación de la seguridad del proceso propuesto para instalaciones biofarmacéuticas se realizó en base a las buenas prácticas de fabricación (BPM) y los principios de calidad por diseño (QbD), los cuales son descritos por el Centro para la Seguridad en Procesos Químicos de AIChE (CCPS, por sus siglas en inglés) [62]. Posteriormente, fue necesario construir un diagrama de flujo de proceso para la producción de vacunas de partículas virales bajo regulaciones cGMP en base a lo definido en la sección 4.8 [63]. Asimismo, se realizó una matriz para la Identificación de Peligros y Evaluación de Riesgos (IPERC) con el propósito de analizar las operaciones unitarias del proceso [63]. En esta etapa, se identificaron los equipos insumos y tareas que presentan mayor riesgo para los operarios en base a lista de verificación propuesta en el diagrama de flujo para la identificación de peligros en el bioproceso como se observa en la **Figura 4.3**.

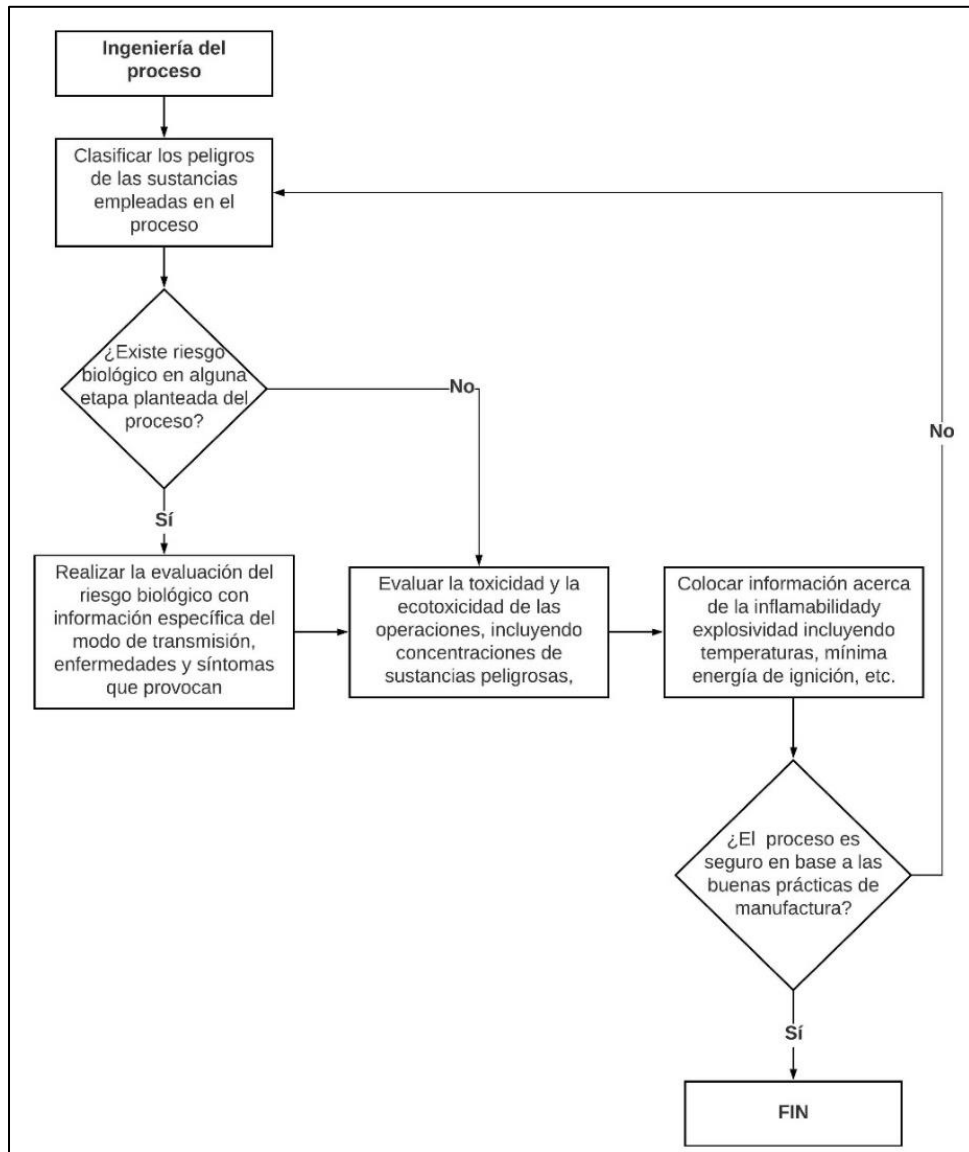


Figura 4.3. Diagrama de flujo de un algoritmo para la identificación de peligros del proceso propuesto [64].

Finalmente, en caso sea necesario, se propondrán estrategias para la implementación de sistemas de seguridad en las etapas que presentan riesgos, por lo que se realizarán las modificaciones adecuadas en cuanto al diseño del proceso.

4.11. Evaluación económica del proceso.

4.11.1. Costo de capital (CAPEX).

Para la estimación del CAPEX del proyecto, se consideró la inversión inicial asociada a la compra e instalación de los equipos, la construcción de la planta, la instrumentación del proceso y el capital de trabajo. En cuanto al costo de compra de los equipos (PC, *Purchased-equipment cost*) actualizado al precio del presente año se utilizó el índice de costos para plantas de ingeniería química (CEPCI, *Chemical Engineering Plant Cost Index*) como se presenta en la siguiente ecuación.

$$C_i = C_b \times \frac{INDEX_i}{INDEX_b} \quad (Ec. 21)$$

Donde C_i representa al costo en el año i , C_b representa el costo en el año base usado como referencia, $INDEX_i$ representa el índice CEPCI en el año i e $INDEX_b$ representa el índice CEPCI en el año base usado como referencia.

Asimismo, fue necesario determinar los costos directos (DC) e indirectos (IC) asociados al proceso en general. En tal sentido, se propusieron valores sugeridos en base a [65] para su determinación como un porcentaje del costo de compra de los equipos (PC) en el Anexo 5.

Finalmente, el CAPEX total se determinó en una hoja de cálculo como una suma ponderada de la inversión de capital fijo (FCI) que incluye el precio de compra (PC), los costos directos (DC), los costos indirectos (IC) y otros costos asociados a la instalación (OC), cuyo valor fue considerado como el 85% de la inversión de capital total, y del capital de trabajo (WC, valor será tomado como el 15% restante de la inversión de capital total).

4.11.2. Costo de operación (OPEX).

Los costos de operación (OPEX) fueron calculados con la determinación de los costos fijos y los costos variables de manufactura asociados al proceso empleando una hoja de cálculo. Los costos variables (materia prima y utilidades) fueron determinados a partir de los balances de materia y energía del proceso, pues representan una estimación del flujo de

capital por unidad de tiempo que se requiere para la operación del proyecto. Los costos fijos se emplearon consideraciones preestablecidas por [59] como se aprecia en el Anexo 6. Finalmente, los porcentajes establecidos asociados a los costos operativos directos e indirectos de un proceso, se presentan también en el Anexo 6.

4.11.3. Costo unitario de producción.

El costo por unidad de masa de producto se calculó utilizando la ecuación 4.22 en una, para lo cual fue necesario conocer el costo anual de producción, la masa de producto producido por cada lote y el número de lotes producidos en un año.

$$Costo\ unitario\ \left(\frac{\$}{kg}\right) = \frac{Costo\ total\ de\ producción\ anual\ \left(\frac{\$}{año}\right)}{Masa\ de\ producto\ por\ lotes\ \left(\frac{kg}{lote}\right) \times Lotes\ producidos\ al\ año\ \left(\frac{lotes}{año}\right)}$$

(Ec. 22)

4.11.4. Índices de rentabilidad (VAN y TIR).

Para el cálculo del valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR) del proceso propuesto se construyó un flujo de caja con una proyección de 5 años en una hoja de cálculo desde el momento de la inversión de capital como se sugiere en [59].

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Establecimiento de la base de diseño.

Para la definición de la capacidad de producción, fue necesario tomar como referencia datos típicos de la producción de vacunas de VLPs producidas en células vegetales. En tal sentido, considerando que el nivel de expresión de las partículas virales enteras del SARS-CoV-2 en *Nicotiana benthamiana* es de 51.0 ± 3.0 (\pm SD, $n = 3$) mg.kg^{-1} de biomasa húmeda, se estima una cantidad de 600 kg de biomasa en un cultivo vertical automatizado para un lote [52]. Asimismo, es importante mencionar que, el contenido de la vacuna consiste principalmente en partículas virales enteras y compuesto activo de la biomasa que principalmente es proteína S del SARS-CoV-2. De esta manera, luego de la lisis celular (etapa de centrifugación secundaria), al ensamblarse la proteína S del SARS-CoV-2 y tomar el tamaño de las partículas virales enteras expresadas en las hojas de *Nicotiana benthamiana*, pasa a formar parte del antígeno que generará respuesta inmune al aplicar la vacuna.

Finalmente, en cuanto al establecimiento de las especificaciones de calidad de la vacuna obtenida en el diseño del proceso (presentadas en la **Tabla 4.1**), se complementan en la **Tabla 5.1**.

Parámetro de especificación del producto	Valor establecido
Concentración por dosis	3.75 μg de VLPs/ dosis.
Impurezas que afecten la estabilidad de la vacuna	Impurezas biológicas residuales, especialmente el ADN de la célula huésped y la proteína de la célula huésped en cada operación unitaria. Al finalizar el proceso,

	la vacuna debe tener una pureza de 95% según estándares regulador por la FDA [66].
Rendimiento específico	0.051 g de partículas virales/kg de biomasa

Tabla 5.1. Parámetros definidos para la especificación del producto final.

5.2. Construcción del BFD.

La construcción del BFD (Anexo 7) incluye todo el proceso de manufactura: la etapa *upstream* (siembra y crecimiento, infiltración, incubación y cosecha, cuyo diseño está fuera del alcance de la tesis), *downstream* (extracción, separación y purificación) y la etapa de concentración y acabado del producto. No obstante, la **Figura 5.1** solo se centra en la etapa *downstream*, la concentración y acabado del proceso.

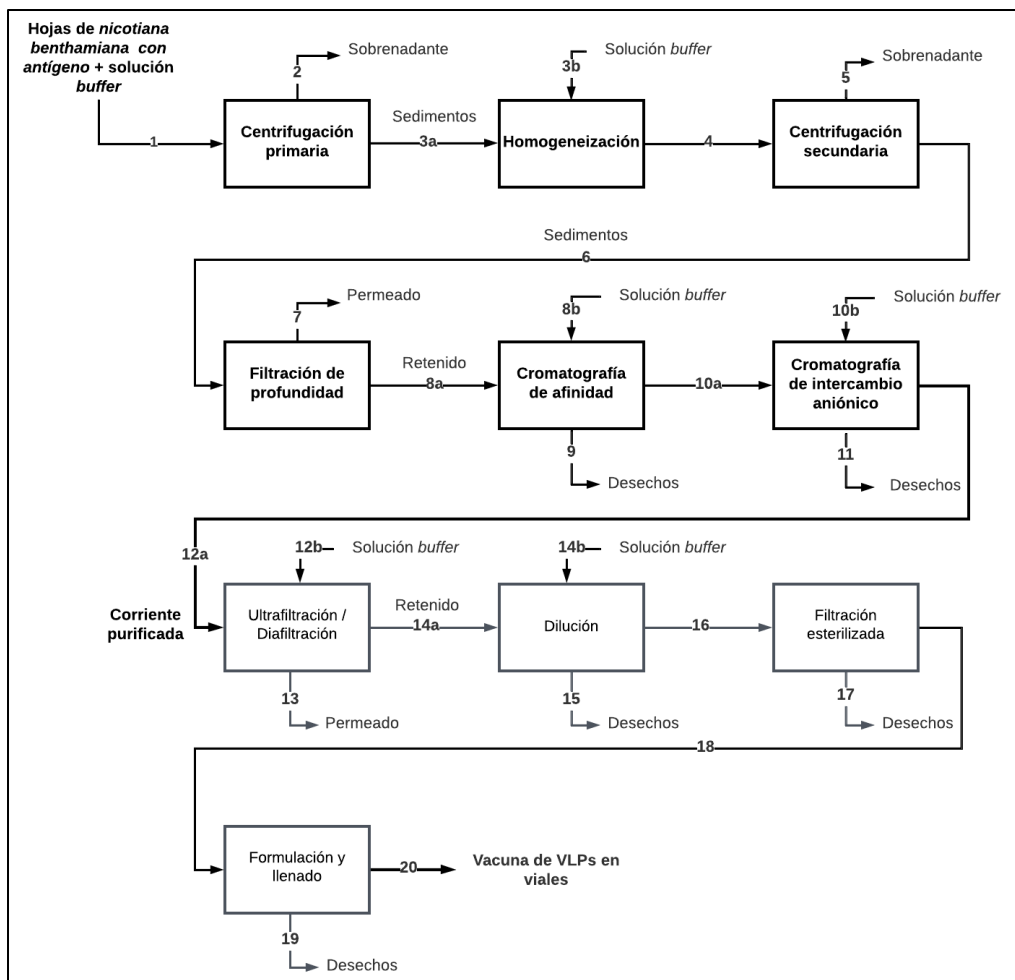


Figura 5.1. Diagrama de bloques de la etapa *downstream*, concentración y acabado del proceso.

5.3. Selección de parámetros del proceso *upstream*.

En la **Tabla 5.2** se presentan los parámetros óptimos para iniciar el proceso aguas arriba, pues las condiciones de entrada al DSP dependen en gran medida de la definición de estos parámetros.

Etapas	Parámetro	Valor
Siembra y crecimiento	Temperatura.	25°C por el día y 22°C por la noche [19].
	Porcentaje de humedad relativa.	70% [19].
	Periodo de crecimiento	35 días [19].
Infiltración	Condiciones	Aislamiento del resto de operaciones unitarias [52].
	Método	Infiltración al vacío [52].
Incubación	Periodo de incubación	5 días [19].

Tabla 5.2. Parámetros definidos del proceso aguas arriba para la producción de vacunas de VLPs contra la COVID-19.

El tiempo total de cada lote desde la siembra hasta la cosecha es de 33 a 55 días, dependiendo de factores como la edad óptima de la planta y el método de expresión transitoria como se detalló en marco teórico [19].

5.4. Definición de parámetros del proceso aguas abajo.

Los parámetros en cada uno de los equipos de las diferentes etapas del proceso aguas abajo son definidos en la **Tabla 5.3** en base a la literatura, cuya secuencia se observa en la **Figura 5.1**.

Etapas		Parámetros y condiciones	
Extracción	Homogeneizador	Temperatura óptima.	30°C [67]

Columna cromatográfica de intercambio aniónico	Solución <i>buffer</i> F (elución)	Citrato de sodio 5 mM + Ácido acético 100 mM [60].
	Solución <i>buffer</i> G (regeneración)	NaOH 100 mM + NaCl 500 mM [60].
	pH	6.5 [60]
	Conductividad	~10 ± 2 mS/cm
	Temperatura	35°C [60]
	Pureza	97% [60]
	Solución <i>buffer</i> H	Na Cl 2M + NaOH 2M [60].
	Pureza	98.5% [70]
	pH	< 7.0 [70]
	Conductividad	5mS.cm ⁻¹ [70]
Resina	Resina de intercambio aniónico <i>Sepharose</i> <i>Fast Flow</i> [71]	
Temperatura purificado	producto 5-7°C [60]	

Tabla 5.3. Parámetros definidos del proceso aguas abajo para la recuperación de VLPs en *Nicotiana benthamiana* contra la COVID-19.

5.5. Balances de materia y energía.

En primera instancia, se realizan las asunciones generales de los equipos principales del proceso aguas abajo, siguiendo el diagrama de flujo presentado en la **Figura 5.1**. Cabe destacar que el balance de energía del proceso general se encuentra en el Anexo 8.

5.5.1. Centrífuga de discos primaria:

Un paso de separación principal es esencial para garantizar que las células y los desechos no deseados se eliminen del caldo de cultivo celular y que se recolecte la proteína de interés. En este proceso, se requieren dos etapas primarias de separación. La primera tiene como objetivo eliminar el material celular y los desechos después de la etapa aguas arriba. El segundo proceso de centrifugación es posterior al paso de lisis celular (homogeneización), ya que el producto forma cuerpos que forman parte del antígeno que están expresados en partículas pequeñas ($<0.9 \mu\text{m}$, como es el caso de la proteína S) y, por lo tanto, debe recuperarse. En ese sentido, se plantean consideraciones para la primera etapa de separación;

- La biomasa después de la molienda es diluida con 1500L de solución *buffer* en un tanque de suspensión antes de ingresar a la centrífuga, dando como resultado la corriente 1 de la **Figura 5.1**.
- La cantidad de sólidos en la corriente 1 se calcula teniendo en cuenta los 1 500 L de solución *buffer* y suponiendo que en el tanque de dilución la concentración de la biomasa seca es de 100 g/L. Además, la relación de peso húmedo/seco de las células es de 4:1.
- La densidad del caldo en la corriente de entrada (1) es de 1 100 kg/L [72].
- En la centrífuga se opera de manera continua con una baja cantidad de sólidos con valores de hasta un 40 % en volumen.
- En una centrífuga de discos, la partícula que se sedimenta tiene un movimiento por convección (paralelo a los discos) y por sedimentación (en sentido horizontal). En ese sentido, se asume que la partícula se mueve a la misma velocidad que el fluido.
- Para alcanzar la separación efectiva en una centrífuga de discos, se tiene como condición que la velocidad de sedimentación de la partícula (al actuar en sentido opuesto) sea mucho menor en comparación al componente de la velocidad de convección [59]. Por tal motivo, se considerará que la relación de la velocidad de alimentación a la centrífuga y el área de clarificación equivalente será de 10^{-8} m/s para una recuperación del 99% de sólidos.
- Se estima que el 5% de las células y el 10% de los restos celulares se transfieren al sobrenadante.

El cálculo de la cantidad de sólidos en la corriente de entrada se presenta en la **Tabla**

5.4.

Parámetro	Ecuación	Valor
Biomasa seca en el tanque de dilución. (Ec. 23)	concentración biomasa seca × volumen de solución buffer	150.00 kg
Biomasa húmeda en el tanque de dilución y corriente de entrada de la centrífuga de discos. (Ec. 24)	Relación en peso de $\frac{\text{biomasa húmeda}}{\text{biomasa seca}}$ (4: 1)	600.00 kg <i>Nota:</i> En la corriente de entrada al proceso <i>downstream</i> solo hay biomasa húmeda porque la seca no reacciona con la solución buffer, entonces se queda en el tanque de dilución
Volumen de sólidos en la corriente de entrada (1). (Ec. 25)	$\frac{\text{masa de biomasa húmeda}}{\text{densidad celular}}$	545.45 L <i>Nota:</i> en la corriente de entrada de la centrífuga se tiene biomasa húmeda con solución <i>buffer</i> .
Volumen de solución <i>buffer</i> en la entrada (1). (Ec. 26)	$\text{Volumen del caldo} - \left(\frac{\text{Masa de BH}}{\text{densidad celular}} \right)$	954.55 L
Contenido de sólidos en la alimentación. (Ec. 27)	$\frac{\text{volumen de biomasa húmeda}}{\text{volumen total}}$	36.36%

Tabla 5.4. Cálculos para la determinación de la cantidad de sólidos en la corriente de entrada a la centrífuga de discos primaria.

Por lo tanto, el porcentaje de sólidos en la corriente de entrada al proceso *downstream* se encuentra dentro de los límites en los que se recomienda operar una centrífuga de discos (máximo 40% de sólidos en volumen). No obstante, se sugiere diluir el caldo 2 veces con la misma cantidad de solución *buffer* para tener una concentración de entrada de 18.18% (v/v)

con el propósito de aprovechar al máximo el rendimiento de la centrífuga como lo menciona [58]. En ese sentido, se adicionan 1500 L de solución buffer en la centrifugación primaria, teniendo como resultado la corriente 1 de la Figura 5.1 con 2454.55 kg de solución *buffer* A (o 2454.55 L).

La velocidad de alimentación de la centrífuga de discos es de 940 L/h, los sedimentos resultantes que contienen la mayor proporción de biomasa entera (hojas de *Nicotiana benthamiana* con VLPs enteras y proteína S) se recogen continuamente para su posterior procesamiento. Es importante mencionar que, el 5% de las células se rompen en la alimentación de la centrífuga y la biomasa de las células rotas es la mitad de los desechos celulares insolubles y la mitad de los contaminantes solubles. Además, se asume que el nivel de deshidratación de la centrífuga de discos es del 60% (valor típico para centrífuga de discos) [58], la presencia de contaminantes en la corriente de alimentación tiene una proporción de 55% para los HCP (ya que son impurezas derivadas de la proteína de interés que no forman parte del antígeno) y 45% para otros contaminantes (DNA, RNA, polisacáridos, clorofila, lípidos, etc). De los HCP, 86.3% de la alimentación se presentan en el sobrenadante

En ese sentido, se presentan los cálculos necesarios para determinar su proporción en las corrientes y los resultados en la **Tabla 5.5**.

Parámetro	Ecuación	Valor
Biomasa sin romperse en la alimentación. (Ec. 28)	biomasa húmeda × biomasa no rota en la alimentación	570.00 kg
Desechos celulares insolubles en la alimentación. (Ec. 29)	biomasa húmeda × % biomasa rota en la alimentación × $\frac{1}{2}$	15.00 kg

Contaminantes solubles en la alimentación (HCP). (Ec. 30)	biomasa húmeda $\times \% \text{ biomasa rota en la alimentación} \times \frac{1}{2}$ $\times 55\%$	8.25 kg
Otros contaminantes en la alimentación. (Ec. 31)	biomasa húmeda $\times \% \text{ biomasa rota en la alimentación} \times \frac{1}{2}$ $\times 45\%$	6.75 kg
Masa de líquido en la entrada. (Ec. 32)	$\left[\text{Volumen de buffer corriente de entrada} \right.$ $\quad + \text{buffer centrífuga}$ $\quad - \left(\frac{\text{masa BH}}{\text{densidad celular}} \right) \left. \right]$ $\times \text{densidad solución centrífuga}$	2454.55 kg
Biomasa en sedimentos. (Ec. 33)	biomasa sin romperse en la alimentación $\times 95\%$	541.50 kg
Biomasa en sobrenadante. (Ec. 34)	biomasa sin romperse en la alimentación $\times 5\%$	28.50 kg
Desechos insolubles en sedimentos (restos celulares). (Ec. 35)	desechos insolubles en la alimentación $\times 90\%$	13.50 kg
Desechos insolubles en sobrenadante (restos celulares). (Ec. 36)	desechos insolubles en la alimentación $\times 10\%$	1.50 kg

Contaminantes solubles en los sedimentos (HCP). (Ec. 37)	$\text{Contaminantes solubles en la alimentación} \times 86.3\%$	7.12 kg
Contaminantes solubles en el sobrenadante (HCP). (Ec. 38)	$\text{Contaminantes solubles en la alimentación} \times 13.7\%$	1.13 kg
Volumen de sólidos en sedimentos. (Ec. 39)	$\frac{\text{biomasa en sedimentos}}{\text{densidad caldo}} + \frac{\text{desechos insolubles}}{\text{densidad teórica desechos}}$	505.01 L
Volumen de líquido en sedimentos. (Ec. 40)	$\frac{\text{volumen de sólidos en sedimentos}}{\text{porcentaje de descarga líquido}} \times \text{relación} \frac{\text{sólido}}{\text{líquido}}$	336.67 L
Desechos solubles en sedimentos. (Ec. 41)	$\frac{\text{desechos solubles en la alimentación}}{\text{volumen líquido en sedimentos}} \times \frac{\text{volumen líquido en sedimentos}}{\text{volumen líquido en alimentación}}$	2.05 kg
Otros contaminantes en sedimentos. (Ec. 42)	$\text{Desechos solubles en sedimentos} - \text{HCP en sedimentos}$	0.92 kg
Otros contaminantes en sobrenadante. (Ec. 43)	$\text{Otros contaminantes en la alimentación} - \text{otros contaminantes en sedimentos}$	5.83 kg
Masa de solución <i>buffer</i> en sedimentos. (Ec. 44)	$\text{Volumen de líquido en sedimentos} \times \text{densidad}$	336.67 kg

Masa de solución buffer en sobrenadante. (Ec. 45)	<i>Volumen de líquido en la alimentación</i> – <i>Volumen de líquido en sedimentos</i>	2117.88 kg
--	---	------------

Tabla 5.5. Cálculos y resultados de las corrientes de la centrifugación primaria.

Ahora, se procede a calcular el rendimiento de la primera operación unitaria.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Biomasa en sedimentos}}{\text{Biomasa en alimentación}} = \frac{541.50 \text{ kg}}{600.00 \text{ kg}} = 90.25\% \quad (\text{Ec. 46})$$

La **Tabla 5.6** presenta los resultados del balance de masas de la primera centrifugación.

Componente		Entrada total (kg)	Alimentación (kg)	Sobrenadante (kg)	Sedimentos (kg)
Sólidos	Biomasa entera	600.00	570.00	28.50	541.50
	Restos celulares	-	15.00	1.50	13.50
Contaminantes solubles	<i>Host Cell Proteins</i>	-	8.25	7.12	1.13
	Otros	-	6.75	5.83	0.92
	Total	-	15.00	12.95	2.05
Solución buffer A		2454.55	2454.55	2117.88	336.67
Masa total		3054.55	3054.55	2160.83	893.72
Volumen	Sólido	545.45	532.33	27.32	505.01
	<i>Buffer</i>	2454.55	2454.55	2117.88	336.67
	Total	3000	2986.87	2145.19	841.68

Tabla 5.6. Balance de masas en la primera centrifugación.

A continuación, en la **Figura 5.2** presenta también un diagrama de flujo representativo de esta primera etapa del proceso aguas abajo.

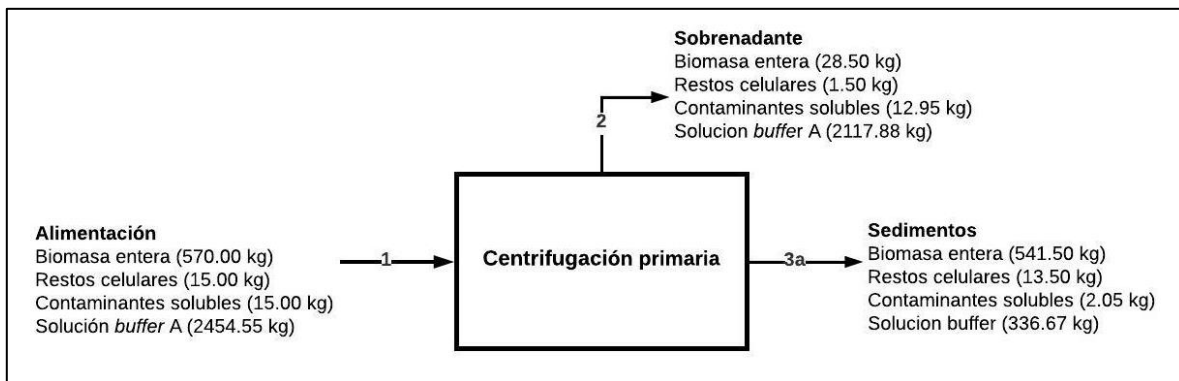


Figura 5.2. Esquema para la primera etapa del procesamiento aguas abajo.

5.5.2. Homogeneizador de alta presión:

Como la proteína se expresa intracelularmente, se requiere una etapa de disrupción celular para romper las células y obtener la proteína objetivo. De esa manera, se detallan las consideraciones a tomar en cuenta para el balance de masa de esta etapa.

- En el homogeneizador se opera de manera continua y se considera que el 5% de las partículas de la alimentación se rompen en la centrífuga de discos.
- El equipo hace que el 98% de las partículas se rompa.
- La escalabilidad es limitada debido a la relación volumen/área y entrada de energía [44].
- Las partículas presentan forma simétrica y son muy porosas. Se considera que la geometría de las partículas sólidas es esférica con un radio de R o una placa delgada con un espesor medio L y que el medio es homogéneo.
- La transferencia de masa de compuestos activos desde el sólido al medio (líquido) es un fenómeno de difusión en el que el coeficiente de difusión es independiente del tiempo. No hay interacción entre ellos.
- La resistencia a la transferencia de masa de la superficie de la partícula es insignificante. La concentración del soluto en el solvente en el interior de la partícula sólida es igual a la concentración del soluto en el solvente.

- Los sedimentos efluentes de la centrífuga de discos se suspenden en 2200 L de solución *buffer* (NaCl 50 mM + BisTris propano 10 mM a pH 8, densidad de 1000 kg/m³), tomando en cuenta una proporción de 4:1 en volumen de solución *buffer* por kg de células.
- Se produce un 90% de restos celulares con un tamaño de partícula grande y un 10% de restos celulares con un tamaño de partícula pequeño (<0.94 μm).
- En cuanto a los contaminantes, se asume que, de la biomasa entera a la entrada, el 55.28% sale en forma de HCP según [44].

A continuación, en la **Tabla 5.7** se presenta los cálculos tomando en cuenta las asunciones realizadas para el homogeneizador de alta presión.

Parámetro	Ecuación	Valor
Masa celular no fracturada. (Ec. 47)	$Biomasa\ entera \times 2\%$	10.83 kg
Masa de solución <i>buffer</i> B en corriente 3b. (Ec. 48)	$Volumen\ de\ buffer \times densidad\ de\ solución\ buffer$	2200.00 kg
Restos celulares como de partícula pequeña en la salida. (Ec.49)	$(Biomasa\ entera\ a\ la\ entrada \times 98\% \times 10\% \times 50\%) + Restos\ celulares\ a\ le\ entrada$	40.03 kg
Restos celulares de partícula grande en la salida. (Ec.50)	$(Biomasa\ entera\ a\ la\ entrada \times 98\% \times 90\% \times 50\%)$	238.80 kg
HCP en la salida. (Ec.51)	$(Biomasa\ entera\ a\ la\ entrada \times 98\% \times 55.28\% \times 50\%) + HCP\ en\ la\ entrada$	147.81 kg

Otros contaminantes en la salida. (Ec.52)	$(\text{Biomasa entera a la entrada} \times 98\% \times 44.72\% \times 50\%)$ + <i>Otros contaminantes en la entrada</i>	119.58 kg
--	---	-----------

Tabla 5.7. Cálculos y resultados de las corrientes de alimentación de la homogeneización de alta presión.

Posterior a ello, se presenta la **Tabla 5.8** con los resultados del balance de masas de la homogeneización a alta presión.

Componente		Alimentación (kg)	Salida (kg)
Sólidos	Biomasa entera	541.50	10.83
	Restos celulares de partícula pequeña	13.50	40.03
	Restos celulares de partícula grande	0.00	238.80
Contaminantes solubles	HCP	1.13	147.81
	Otros	0.92	119.58
	Total	2.05	267.39
Solución <i>buffer</i> A		336.67	336.67
Solución <i>buffer</i> B		2200.00	2200.00
Masa total		3093.72	3093.72
Volumen (L)	Sólido	505.01	274.21
	<i>Buffer</i> (A+B)	2536.67	2536.67
	Total	3041.68	2810.88

Tabla 5.8. Balance de masas en el homogeneizador de alta presión.

Finalmente, se presenta el diagrama de bloques correspondiente a la etapa de homogeneización en **Figura 5.3**.

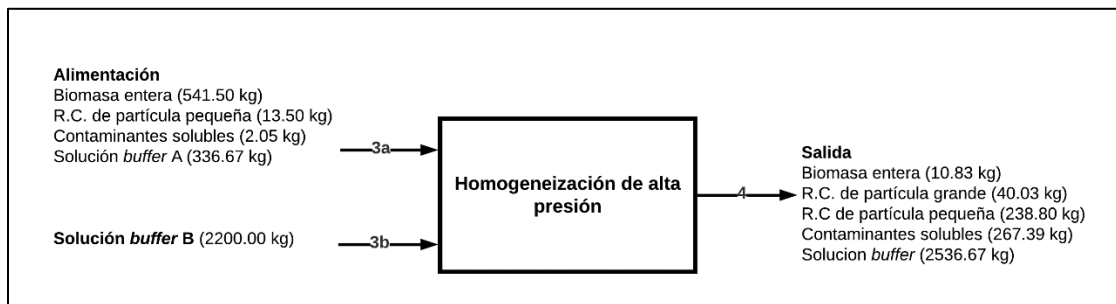


Figura 5.3. Esquema para la segunda etapa del procesamiento aguas abajo.

5.5.3. Centrífuga de discos secundaria:

- La centrífuga opera de manera continua, y las corrientes de salida pueden contener hasta un 40 % de sólidos en volumen en la recuperación de sólidos. El nivel de deshidratación de la centrífuga es 60%.
- En la alimentación a la centrífuga de discos secundaria, se considera el 95% de la biomasa entera inicial, para los restos celulares de partícula pequeña se considera la cantidad inicial más 2.50% de biomasa entera. En el caso de los contaminantes, se considera el 1.39% y el 1.11% adicional de la biomasa entera inicial para los HCP y otros contaminantes, respectivamente según [59].
- De los restos celulares de partícula grande ($> 0.94 \mu\text{m}$), se sabe que hay expresados 51 mg de VLPs enteras. kg^{-1} biomasa. En ese sentido, se calcula que las VLPs enteras salen por los sedimentos. Por otro lado, de los restos celulares de partícula pequeña, se forman cuerpos o proteínas que forman parte del antígeno alcanzado un tamaño $> 0.94 \mu\text{m}$, por lo que según lo sugerido por [25], el 1.13% sale por los sedimentos como VLPs.
- De la biomasa entera, 5% es fracturada durante la centrifugación y sale por el sobrenadante. Asimismo, debido a que se llevó a cabo un rompimiento intracelular en la etapa anterior y con el uso de solución *buffer* de lisis en esta etapa (debilita las estructuras de las paredes celulares), se obtiene en los sedimentos VLPs enteras expresadas [59].
- La densidad de la biomasa entera es de 1.10 kg/L y la de los desechos de partícula grande de 1.12 kg/L.

- El flujo atraviesa los espacios del disco ya que ingresa por la parte superior de la centrífuga
- Una condición necesaria para alcanzar una separación efectiva, es que la velocidad convectiva de la partícula sea mucho mayor que el componente de la velocidad de sedimentación que actúa en sentido opuesto [59].

Posterior a la definición de asunciones, se presentan las ecuaciones empleadas para el balance de masas de la segunda centrífuga de discos en la **Tabla 5.9**.

Parámetro	Ecuación	Valor
Biomasa entera en la alimentación. (Ec. 53)	$Biomasa\ a\ la\ entrada \times 95\%$	10.29 kg
Desechos de partícula grande en la alimentación. (Ec. 54)	$(Biomasa\ a\ la\ entrada \times 2.5\%)$ $+ Desechos\ de\ partícula\ grande\ en\ la\ entrada$	40.30 kg
HCP en la alimentación. (Ec. 55)	$(Biomasa\ a\ la\ entrada \times 1.39\%)$ $+ Desechos\ de\ partícula\ grande\ en\ la\ entrada$	147.96 kg
Otros contaminantes. (Ec. 56)	$(Biomasa\ a\ la\ entrada \times 1.11\%)$ $+ Desechos\ de\ partícula\ grande\ en\ la\ entrada$	119.70 kg
Biomasa entera en el sobrenadante. (Ec. 57)	$Biomasa\ en\ la\ alimentación$ $\times 5.1 \cdot 10^{-5} \frac{g\ VLPs\ enteras}{kg\ biomasa}$	0.53 g
VLPs expresadas de la biomasa entera en	$Biomasa\ en\ la\ alimentación$ $- Biomasa\ en\ el\ sobrenadante$	9.78 kg

sedimentos (Ec.58)		
Restos celulares de partícula pequeña como antígeno (Ec. 59)	<i>Restos celulares de partícula pequeña × 1.13%</i>	455.40 g
Restos celulares de partícula pequeña en sobrenadante (Ec. 60)	<i>Restos celulares de part. pequeña en la alimentación – VLPs generadas de los restos celulares de partícula pequeña</i>	39.84 kg
Restos celulares de partícula grande en el sobrenadante como antígeno (Ec. 61)	<i>Desechos de partícula grande en la alimentación $\times 5.1 \cdot 10^{-5} \frac{\text{g VLPs enteras}}{\text{kg biomasa}}$</i>	12.18 g
Restos celulares de partícula grande en los sedimentos. (Ec. 62)	<i>Desechos de partícula grande en la alimentación – VLPs expresadas de los restos de partícula grande</i>	226.62 kg
Volumen de sólidos en los sedimentos. (Ec. 63)	$\frac{(\text{Biomasa entera} + \text{VLPs en los sedimentos})}{\text{densidad}} + \frac{\text{Desechos de partícula grande}}{\text{densidad}}$	41.20 L
Volumen de <i>buffer</i> (A+B) en sedimentos. (Ec. 64)	$\frac{\text{Volumen de sólidos en sedimento}}{\% \text{ deshidratación}} \times 40\%$	27.47 L

Contaminantes solubles en sedimentos. (Ec. 65)	$\frac{\text{Masa de contaminantes solubles en alimentación}}{\text{Volumen de buffer en alimentación}} \times \text{Volumen de buffer en sedimentos}$	2.90 kg
HCP en sedimentos. (Ec. 66)	$\text{Contaminantes solubles en sedimentos} \times 99\%$	2.87 kg
Otros contaminantes en sedimentos. (Ec. 67)	$\text{Contaminantes solubles en sedimentos} \times 1\%$	0.03 kg

Tabla 5.9. Cálculos y resultados de las corrientes de alimentación de la centrifugación secundaria.

A continuación, se presenta la **Tabla 5.10** con los resultados del balance de masas de la segunda centrifugación. Y, en la **Figura 5.4**, se muestra el diagrama de bloques correspondiente a esta etapa.

Componente		Alimentación (kg)	Sobrenadante (kg)	Sedimentos (kg)
Sólidos	Células enteras	10.29	0.51	9.25
	Restos celulares de partícula pequeña	40.30	39.84	*La cantidad generada se toma en las VLPs enteras
	Restos celulares de partícula grande	238.80	226.62	*La cantidad expresada se toma en las VLPs enteras.

Producto	Antígeno	0.00	0.00	0.47
Contaminantes solubles	HCP	147.96	145.09	2.87
	Otros	119.70	119.67	0.03
	Total	267.66	264.76	2.90
Solución buffer (A+B)		2536.67	2509.20	27.47
Masa total		3093.72	3017.31	76.42
Volumen	Sólido	274.21	233.01	41.20
	Buffer (A+B)	2536.67	2509.20	27.47
	Total	2810.88	2741.21	68.67

Tabla 5.10. Balance de masas en la segunda centrifugación.

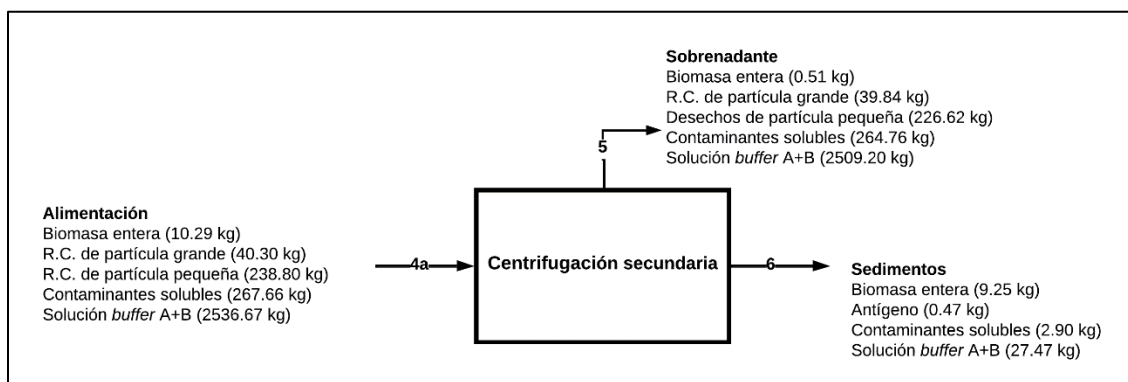


Figura 5.4. Esquema para la tercera etapa del procesamiento aguas abajo.

5.5.4. Filtración de profundidad:

Es importante mencionar que, el filtro de profundidad se empleó antes de los pasos de cromatografía con el propósito de disminuir el contenido de impurezas y proteger la resina de las columnas cromatográficas por el alto costo que estas presentan [45]. Entre las principales características se encuentra su buena resistencia mecánica, química y térmica.

- Proceso por lotes.

- En este paso, se supone que los desechos de partícula grande tendrán una retención mucho mayor de entre el 80% y el 90%. Como algunas moléculas de HCP pueden tener tamaños más pequeños, se asume que el 50% de estas moléculas se trasladarán.

Dado que el flujo proviene de la centrífuga de discos, presenta aún cantidades considerables de contaminantes solubles y desechos sólidos como se evidencia en la Tabla 5.8. En ese sentido, es importante mencionar que la mayoría de los sólidos y parte de los contaminantes solubles son retenidos por el medio. El permeado que pasa a través del medio que contiene la mayor parte del producto se recoge para la etapa de cromatografía adicional. Esto tiene la ventaja de que al concentrar inicialmente el flujo de entrada al tanque, se requiera un menor tiempo y área de membrana para la filtración como se mencionó en el estado del arte [73].

Consecuentemente, se presenta la **Tabla 5.11.** con los porcentajes asumidos de la reducción de contaminantes en el filtro de profundidad.

Componentes	Remoción (%)
Antígeno	100%
HCP	50%
Otros contaminantes solubles	25%
Solución <i>buffer</i> A y B	90%

Tabla 5.11. Porcentajes asumidos de reducción de componentes en el filtro de profundidad.

Los resultados del balance de masas del sistema se presentan en la **Tabla 5.12.**

Componente		Entrada (kg)	Salida (kg)	
		Carga	Retenido	Permeado
Sólidos	Biomasa residual	9.25	8.36	0.93
	VLPs	0.47	0.00	0.47

	Desechos partícula grande	0.00	0.00	0.00
	Desechos partícula pequeña	0.00	0.00	0.00
Contaminantes solubles	HCP	2.87	1.43	1.43
	Otros	0.03	0.02	0.01
	Total	2.90	1.46	1.44
Solución <i>buffer</i> (A+B)		27.47	2.75	24.72
Masa total		76.42	48.85	27.57
Volumen (L)	Sólidos	41.20	41.20	0.00
	<i>Buffer</i>	27.47	2.75	24.72
	Total	68.67	43.95	24.72

Tabla 5.12. Balance de masas en la filtración de profundidad.

Asimismo, se muestra el diagrama de bloques correspondiente a la etapa de filtración de profundidad en la **Figura 5.5**.

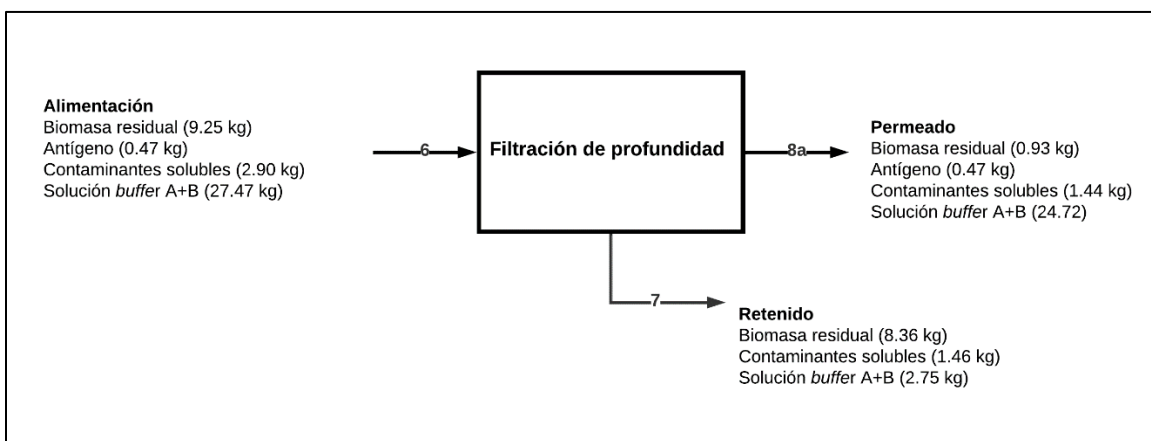


Figura 5.5. Esquema para la cuarta etapa del procesamiento aguas abajo.

5.5.5. Cromatografía de afinidad:

- La concentración de proteína que se obtiene del modelo de Langmuir del sistema es cero durante toda la etapa de elución.
- Se asume que el coeficiente de diámetro de poro es igual al diámetro medio de poro de la membrana.
- La velocidad del flujo intersticial es constante y uniforme sobre la columna como resultado de una distribución y recolección de flujo efectivas en la entrada y salida de la columna [74]. No se incluyen variaciones radiales de los valores de concentración de todas las especies.
- El calor generado en el sistema es insignificante, pues la diferencia de temperaturas entre el sistema y el entorno es mínima
- Los componentes no se acumulan dentro de la columna (todo se eluye en la etapa final). Lo cual significa que esta operación se da en estado estacionario.
- La columna se equilibra y luego se carga con el permeado de la etapa de filtración anterior. También se considera que el permeado se puede mantener en un tanque de retención durante algún tiempo.

5.5.6. Cromatografía de intercambio aniónico:

- Las variables de estado son la concentración intersticial, la concentración de la fase móvil y la concentración de la fase estacionaria.
- El proceso es continuo.
- La recuperación es del 75% y la pureza esperada del 95%.
- El aumento de la capacidad dinámica de adsorción se puede obtener mediante el aumento del pH (disminuir la carga de proteínas) o la conductividad (es decir, fuerza iónica) del entorno de la solución.

En el Anexo 9 se presenta una tabla considerando los cambios de temperatura y presión en las diferentes etapas del proceso con el propósito de dimensionar los equipos principales y auxiliares.

5.6. Diseño y dimensionamiento del procesamiento *downstream*.

Luego de la obtención de resultados del balance de materia y energía, se emplearon las ecuaciones de diseño presentadas en la metodología para cada equipo propuesto.

5.6.1. Diseño de la etapa de separación y extracción.

En el caso de la primera centrífuga de discos, la relación entre la velocidad de alimentación y la centrífuga (Q) y el área de clarificación equivalente (Σ) es utilizada para calcular el rendimiento de operación que se puede lograr para un conjunto dado de condiciones de operación. Un valor Q/Σ más bajo proporciona un mejor rendimiento. Un valor típico de Q/Σ para la recuperación del 99% de VLPs en una centrífuga de discos es de 10^{-8} m/s [72]. Por tal motivo, se elige una centrífuga a escala industrial Westfalia SC35 para el proceso de separación primaria. Las especificaciones de la centrífuga Westfalia SC35 se dan en la **Tabla 5.13**.

Centrífuga de discos primaria	
Modelo de la centrífuga de discos 1	Westfalia SC35
Velocidad máxima de rotación (rps)	120
Flujo volumétrico máximo (L/h)	25 000
Volumen del tazón (L)	18
Volumen de contenido de sólidos (L)	7.5
Mecanismo de recuperación de sólidos	Descarga intermitente
Área de asentamiento (m²)	26 000

Tabla 5.13. Características de la centrífuga de discos 1 (Westfalia SC35) [72].

Posteriormente, en la etapa de homogeneización como la fracción de proteínas liberadas respecto a la proteína total presente depende de la localización de esta en la estructura celular, se emplea la ecuación (6) de la sección de metodología para determinar el número de pasos que requiere el homogeneizador. En ese sentido, se determina el término 1 de la ecuación como se aprecia en la **Tabla 5.14**.

Número de paso	Proteína liberada (%)	$\ln \left[\frac{R_m}{R_m - R} \right]$
1	63	0.994
2	79	1.561
3	88	2.120
5	96	3.219
10	99.9	6.908

Tabla 5.14. Determinación del término principal de la ecuación que modela el proceso del rompimiento celular a partir de datos de la literatura [59].

Con los resultados obtenidos de la **Tabla 5.14** se procede a graficar a través de un ajuste polinomial el término 1 de la ecuación (6) respecto al número de pasos en la **Figura 5.6**.

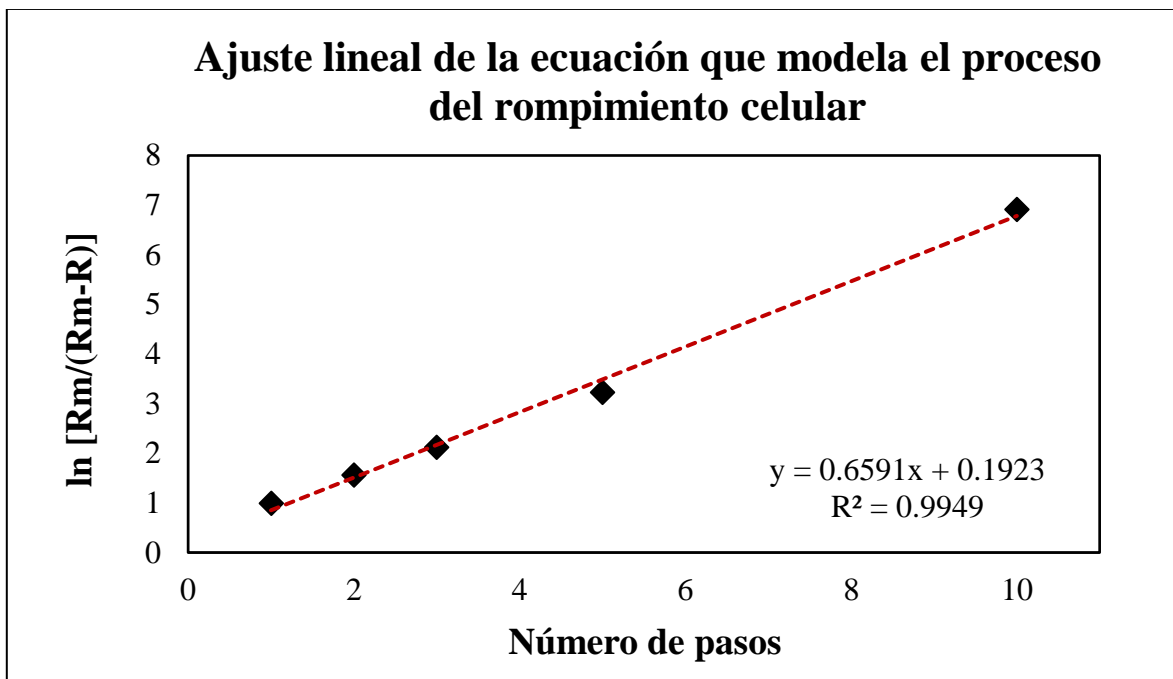


Figura 5.6 Ajuste polinomial de la ecuación que modela el proceso del rompimiento celular con los datos obtenidos de la **Tabla 5.14**.

Así pues, dada la tendencia lineal de la gráfica, se procede a determinar el valor de la constante cinética con la pendiente de la ecuación $y=0.6591x + 0.1923$.

$$k \times P^{2.2} = 0.6591 \quad (\text{Ec. 68})$$

$$k = 9.7758 \times 10^{-5} \text{ MPa}^{-2.2}$$

Ahora, se calcula el número de pasos necesarios para tener un 98% de proteínas liberadas.

$$N = \frac{\ln\left(\frac{1}{1-0.98}\right)}{0.000097 \times 55^{2.2}} \quad (\text{Ec. 69})$$

$$N = 5.935 \text{ pasos}$$

Posteriormente, se realizan algunos cálculos para el diseño de las variables operacionales en el homogeneizador, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 5.15**.

Variable	Valor Calculado	Referencia
Potencia del motor eléctrico (W)	850	[75]
Tamaño máximo de la propela (m)	0.03	[75]
Número de Reynolds	46 007.39	Calculado
Potencia nominal requerida (W)	404.61	Calculado

Tabla 5.15. Cálculos de diseño del homogeneizador de alta presión.

Con los resultados obtenidos anteriormente, se procede a seleccionar un homogeneizador Microfluidizer® M-7125 del catálogo [76] con las especificaciones técnicas presentadas en la **Tabla 5.16**.

Microfluidizer® M-250	
Rango de presión de trabajo	Hasta 689 bar
Flujo volumétrico del producto	4.13 gmp (15.6 lpm)
Temperatura de entrada	75°C como máximo
Requerimientos	<ul style="list-style-type: none"> • Agua de enfriamiento para el intercambiador de calor de aceite hidráulico. • Agua de enfriamiento para el intercambiador de calor del fluido del proceso.

	<ul style="list-style-type: none"> Aire comprimido para la bomba de alimentación (0.6 m³/min a 6.2 bar)
Dimensiones (ancho, alto y fondo)	74 x 180 x 145 cm
Volumen	1.9314 m ³

Tabla 5.16. Especificaciones técnicas del homogeneizador de alta presión elegido [76].

5.6.2. Diseño de la etapa de clarificación.

La etapa de clarificación inicia con la operación de una centrífuga de discos, y tal como se mencionó en la sección de metodología, los parámetros de diseño y operación dependen de la alimentación y de la geometría de la centrífuga. Estos valores se presentan en la **Tabla 5.17**, cabe mencionar que el flujo volumétrico fue calculado en la etapa de homogeneización a alta presión.

Parámetro	Variable	Valor asignado
Flujo volumétrico (m³/s)	Q	2.611 x 10 ⁻⁴
Densidad del cultivo celular (kg/m³)	ρ_L	1518
Densidad celular (kg/m³)	ρ_S	1054
Velocidad de rotación (rad/s)	ω	314
Diámetro promedio de la partícula (μm)	d_F	5
Viscosidad del medio (kg/m³)	μ_L	10 x 10 ⁻⁴
Rendimiento	-	0.98

Tabla 5.17. Definición de parámetros de diseño con datos extraídos de la literatura para la centrífuga de discos 2 [58].

Posteriormente, se procede a determinar el factor sigma, la velocidad terminal y el diámetro mínimo de paso de la centrífuga según la ecuación 7 presentada en la metodología. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.18**.

Variables de diseño calculadas		
Parámetro	Variable	Valor obtenido

Factor sigma (m²)	Σ	1146.329
Velocidad terminal (m/s)	v_g	3.03×10^{-7}
Diámetro mínimo (µm)	d_{min}	0.949

Tabla 5.18. Variables de diseño calculadas para la centrífuga de discos 2.

A partir de los resultados obtenidos de la **Tabla 5.18**, las partículas que tengan un diámetro mayor a 0.949 µm serán eliminadas por la centrífuga en los sedimentos, y las partículas que tengan un diámetro menor a 0.949 µm permanecerán en el sobrenadante. Asimismo, como las HCPs son proteínas producidas o codificadas por los organismos huésped que se utilizan para producir las partículas similares a virus (VLPs), suelen tener un diámetro muy pequeño que va desde los 0.1 a 0.25 µm [77]. En ese sentido, se espera que este contaminante soluble se encuentre en gran proporción en el sobrenadante ($d < d_{min}$) tal como se presentó en la Tabla 5.8. De igual modo, se procede a seleccionar una centrífuga de discos de la marca Crown Machinery con las características que se presentan en la **Tabla 5.19**.

Centrífuga de discos secundaria	
Modelo de la centrífuga de discos 1	DGS/DGC 360
Velocidad mínima de rotación (rps)	117.3
Flujo volumétrico máximo (L/h)	1500
Volumen del tazón (L)	12
Mecanismo de recuperación de sólidos	Descarga intermitente
Motor (kW)	580
Dimensiones (ancho, alto y fondo) (mm)	810x958x1139
Volumen de la centrífuga (m³)	0.884

Tabla 5.19. Características de la centrífuga de discos 2 (DGS/DGC 360) [72].

Finalmente, se emplea un filtro de profundidad con un medio de retención de partículas en todo el medio, en lugar de solo en la superficie del medio como lo menciona El-Sabbahy et al. [77]. La retención se dará por atrapamiento mecánico y clarificará la corriente de permeado. En ese sentido, para este paso se emplea un filtro de profundidad 3M Zeta PlusTM

[78] con un tamaño de poro de 0.45 μm . El volumen de la suspensión introducida en el filtro es de 80 litros. Por lo tanto, elegimos un modelo de soporte pequeño 16EZA disponible para un volumen de trabajo de 25-200L. Este soporte puede alojar de una a cuatro cápsulas de 0.23 m^2 o una cápsula de 1.6 m^2 (de doble capa) o de 2.5 m^2 (de una sola capa).

Así pues, en una filtración de profundidad de pH bajo, se puede lograr una recuperación de producto de más del 95% a un nivel de carga superior a 100 L/m^2 [53]. En tal sentido, sobre la base de la suposición, se calcula el área de filtro efectiva máxima.

$$\text{Área del filtro} = \frac{80 \text{ L}}{100 \frac{\text{L}}{\text{m}^2}} = 0.8 \text{ m}^2 \quad (\text{Ec. 70})$$

Según el cálculo, se deben colocar tres cápsulas de 0.23 m^2 en el porta filtros para obtener un área total de filtrado de 0.69 m^2 . En ese sentido, las HCPs pueden eliminarse eficazmente mediante un filtro de profundidad 3M con un caudal que varía entre 50 y 100 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$ [78] elige un caudal de 60 LMH ($\text{L}/\text{m}^2.\text{h}$). A continuación, se calcula el tiempo necesario para esta operación unitaria empleando considerando el área del filtro, el volumen a tratar y el caudal.

$$\text{Tiempo de filtración} = \frac{80 \text{ L}}{60 \frac{\text{L}}{\text{m}^2 \times \text{h}} \times 0.69 \text{ m}^2} = 1.93 \text{ horas} \quad (\text{Ec. 5.71})$$

Con lo antes mencionado, el filtro de profundidad propuesto como última etapa de clarificación, puede retener eficazmente los contaminantes sólidos que no pueden atravesar los medios porosos, incluidos las células y los desechos celulares [79]. El filtro de profundidad también puede eliminar las partículas contaminantes solubles más pequeñas que el tamaño de sus poros. El medio filtrante tiene una carga ligeramente positiva modificada para atrapar partículas cargadas negativamente dentro de un rango de pH basado en la hidrolización dejando libres iones en el medio (atracción electrocinética). Así pues, se puede lograr una remoción altamente efectiva de hasta un 98% utilizando un pH de 4.75, pues en este rango se tiene una carga neta de endotoxinas y ADN residual como lo menciona [80]. No obstante, dado que las VLPs como proteínas recombinantes tienen un punto isoeléctrico

de 4.86, es importante controlar el pH del medio filtrado en profundidad en un rango de 4.0-4.98 con el propósito de mantener la proteína objetivo cargada positivamente para impedir su disolución y minimizar la adsorción de producto por el medio.

Finalmente, se presentan las especificaciones del filtro de profundidad elegido en la **Tabla 5.20**.

Filtro de profundidad EZ-106A	
Área del filtro (m²)	0.69
Tipo	Cartucho de filtro
Tamaño de poro (µm)	0.45
Temperatura máxima(°C)	82
pH de operación	4.0-4.98
Temperatura de operación (°C)	20-70

Tabla 5.20. Características del filtro de profundidad [78].

5.6.3. Diseño de la etapa de purificación

El primer paso en la purificación es la etapa de captura, donde se plantea el uso de un arreglo de columnas cromatográficas de afinidad con proteína A. Específicamente, se seleccionan 3 columnas cromatográficas periódicas de modo contracorriente (3C-PCC) tal como lo sugiere [45] mencionado en el capítulo 3 de estado del arte. En la **Figura 5.7**, se muestra y explica el funcionamiento del arreglo de columnas propuesto. Es importante mencionar que, en las etapas de lavado, elución, regeneración y equilibrio se utilizan diferentes volúmenes, los cuales son descritos en el Anexo 10 resultados que se muestran junto a propiedades de importancia para el diseño como la composición y el pH.

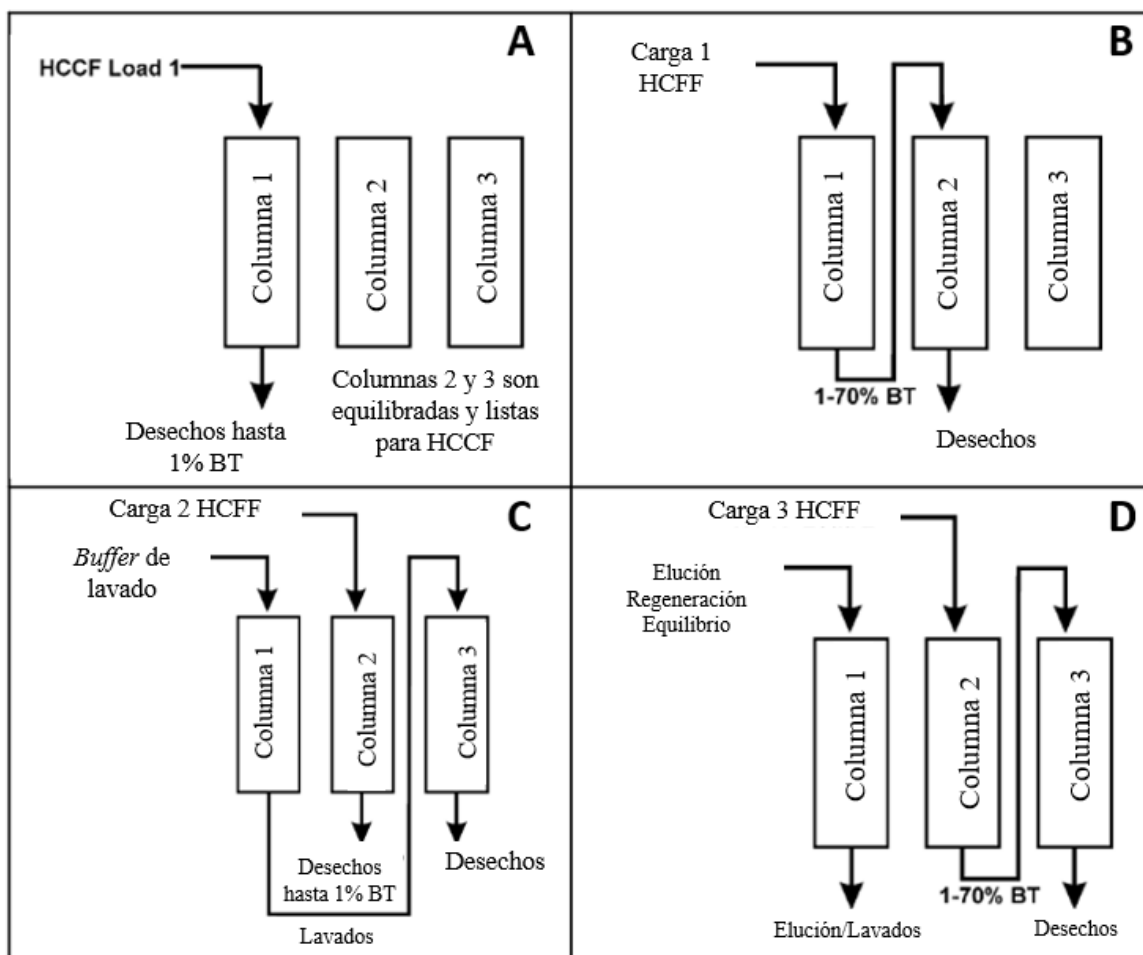


Figura 5.7. Diagrama del arreglo de columnas propuesto (3C-PCC). **(A)** Paso 1: El fluido de cultivo celular recolectado (HCCF) se carga en la columna 1 hasta que la columna alcanza el 1% de capacidad de ruptura (BT); las columnas 2 y 3 están equilibradas y listas para aceptar la carga HCCF. **(B)** Paso 2: Una vez que se alcanza el 1% de BT, el efluente de la columna 1 se desvía a la columna 2 para capturar la proteína no unida de la columna 1. El HCCF se carga en la columna 1 hasta que se alcanza el 70% de BT. **(C)** Paso 3: La carga se dirige a la columna 2 y la columna 1 se somete a ciclos de lavado. Debido a que se pierde algo de proteína en los lavados, el efluente del lavado de la columna 1 se dirige a la columna 3 para capturar la proteína perdida en los lavados. **(D)** Paso 4: Finalmente, la columna 1 se eluye, regenera y equilibra mientras se cargan las columnas 2 y 3.

Para el análisis de esta primera etapa de purificación, se utilizó una biblioteca de herramientas específica para cromatografía líquida CADET [56], la cual nos permite la realización de una simulación directa del modelo de adsorción del arreglo cromatográfico

comprendido en varios pasos (mostrados en la Figura 5.3). El Anexo 11 presenta el código en Matlab™, donde se tiene en consideración la instalación del paquete CADET para su correcto funcionamiento. Los parámetros para el diseño de la columna cromatográfica de afinidad como el coeficiente de transferencia de masa (k_f), el coeficiente de dispersión axial (D_{ax}) y el coeficiente de difusión de poros (D) son presentados en la **Tabla 5.21** obtenidos de [56]. De igual manera, en lo que respecta a la resina de afinidad se utilizó una de la marca ProSep® vA (Millipore Corporation, Billerica, MA) por la disponibilidad de información de propiedades como la porosidad intraparticular (ϵ_p), porosidad extraparticular (ϵ) y el radio de la partícula de la resina (r_p) para realizar un análisis de los modelos matemáticos como se muestra en la sección de metodología [60].

	Parámetros		
Parámetros generales de la columna	Modelo utilizado	Isoterma de Langmuir	
	Dax	5.75×10^{-8}	m ² /s
	Kf	6.9×10^{-6}	m/s
	Dp	6.07×10^{-11}	m ² /s
Geometría de la columna	L	0.014	m
	Rp	0.000045	m
	e	0.37	-
	ep	0.75	-
	k _A	1.14	m ³ /mol.s
	k _D	0.002	1/s
	q _{max}	4.88	mol/m ³
Entrada	c ₀	0.00714	mol/m ³

Tabla 5.21. Parámetros de diseño y adsorción del arreglo de 3 columnas cromatográficas de afinidad.

Luego de la definición de parámetros, se graficaron las curvas *breakthrough* (BTCs) como se aprecia en la **Figura 5.8**, variando la velocidad de alimentación verificando cómo esta variable influye en la productividad del arreglo de 3 columnas cromatográficas. La

importancia de esta gráfica es ilustrar el comportamiento de una columna de lecho fijo en relación a la cantidad de proteína retenida y se expresa como la concentración normalizada, que a su vez es definida como la relación entre la concentración del efluente y la concentración de entrada, como función del tiempo.

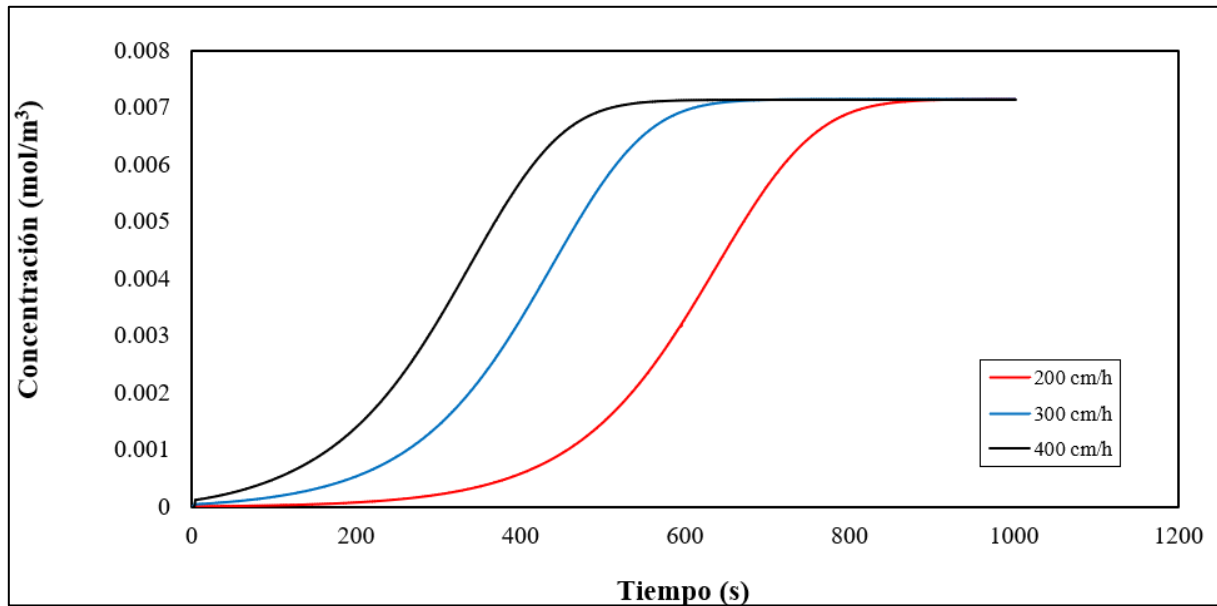


Figura 5.8. Curva de *breakthrough* para tres velocidades intersticiales diferentes.

En la figura anterior, se evidencia una clara diferencia utilizando una velocidad lineal de 200 cm/h (menor valor propuesto) en comparación a 400 cm/h (mayor valor propuesto). Específicamente, se aprecia que, al utilizar una velocidad intersticial mayor, la columna llega al 100% de su capacidad en un menor tiempo, aproximadamente en un 40% menor al valor inicial de 200 cm/h. Asimismo, la forma de la curva de *breakthrough* es favorable como se menciona en el estudio de [81], pues tiene una forma convexa, lo que representa una gran cantidad de adsorción a una baja concentración.

Para analizar la productividad, se tuvo en consideración el área bajo las curvas de *breakthrough* (BTCs), en un valor de 50% como lo sugiere [82] tomando valores correspondientes al t_{RR} y t_{cw} de un arreglo ya realizado. Para lograr lo mencionado, se utilizó

nuevamente Matlab y el *toolkit* CADET teniendo en cuenta el área por encima de la BTCs se obtienen los resultados presentados en la **Tabla 5.22**.

	200 cm/h	300 cm/h	400 cm/h
moles (mol)	0.00046	0.00036	0.00028
c_0(mol/m³)	0.0071	0.0071	0.0071
Largo de lecho (cm)	1.40	1.40	1.40
Diámetro de lecho (cm)	2.80	2.80	2.80
Tiempo de residencia del alimento interconectado RT_c (min)	1.06	0.71	0.40
t_{cw} (min)	5	5	5
Tiempo de alimentación interconectado t_c (min)	16.25	2.85	0.85
t_{RR} (min)	40.25	40.25	40.25
t_{cycle} (min)	135.75	135.75	135.75
P_c (g/L/h)	8.58	7.07	6.47

Tabla 5.22. Determinación de la productividad y otros parámetros de diseño a partir de las curvas de *breakthrough*.

Se selecciona la velocidad intersticial de 200 cm/h al analizar que, pese a que esta aumente, la productividad solo se ve afectada en un 17% respecto al valor inicial. En ese sentido, es conveniente elegir la velocidad intersticial menor que nos brinde una mayor productividad. De modo que, se procede a calcular la cantidad de *buffer* que será necesaria para llevar a eluir la columna como se presenta en la **Tabla 5.23** de acuerdo a la información extraída de [45].

Corrientes en las 3C-PCC	Volúmenes (L)
Lavado Interconectado (solución <i>buffer</i> C)	12.25

Lavado 1 (solución <i>buffer</i> D)	20.87
Lavado 2 (solución <i>buffer</i> E)	16.51
Elución (solución <i>buffer</i> F)	20.87
Regeneración (solución <i>buffer</i> G)	12.25
Reequilibrio (solución <i>buffer</i> D)	20.87
Total	103.62

Tabla 5.23. Volúmenes de solución *buffer* necesario por ciclo en la columna de afinidad.

Para calcular cuántos ciclos serán necesarios para procesar el flujo de alimentación, se emplea la productividad obtenida a 200 cm/h aumentando el diámetro de la columna en 4 veces para escalas el proceso manteniendo el largo de la columna constante. El valor de 8.58 g/L/h es multiplicado por el total de litros presentes en las tres columnas. Posteriormente, la cantidad de antígeno fue dividida entre el valor de la productividad en g/h obteniendo 617.48 minutos y utilizando el tiempo que tarda cada ciclo, se obtuvo que es necesario realizar 4.55 ciclos. Finalmente, el volumen requerido por ciclo se multiplicó también por las 3 columnas y luego por los 5 ciclos obteniendo la cantidad total de litros como se evidencia en la **Tabla 5.24.**

Componente		Entrada (kg)	Salida (kg)	
		Carga	Desechos	Permeado
Sólidos	Biomasa residual	0.93	0.93	0.00
	Antígeno	0.47	0.01	0.46
	Desechos partícula grande	0.00	0.00	0.00
	Desechos partícula pequeña	0.00	0.00	0.00

Contaminantes solubles	HCP	1.43	1.42	0.01
	Otros	0.01	0.01	0.00
	Total	1.44	1.43	0.01
Solución buffer (A+B)		24.72	24.72	0.00
Solución buffer (C+D+E+F+G)		103.62	98.45	5.18
Masa total		131.19	125.54	5.65
Volumen (L)	Buffer (A+B)	24.72	24.72	0.00
	Buffer C	12.25	11.64	2.09
	Buffer D	41.74	39.65	0.83
	Buffer E	16.51	15.68	1.04
	Buffer F	20.87	19.83	0.61
	Buffer G	12.25	11.64	0.61
	Total	128.34	123.17	5.17

Tabla 5.24 Balance de materia en columna cromatográfica de afinidad.

Con esta información, se selecciona una columna cromatográfica de afinidad de la marca Sartorius [83], sus especificaciones se muestran en la **Tabla 5.25**.

BioSMB Process 350	
Dimensiones (ancho, fondo y alto)	2.7, 1.3 y 2.1m
Flujo volumétrico máximo	350 L/h
Máxima presión de operación	2.5 bar
Suministro de aire	4 bar con regulador de presión integrado
Suministro de energía	Trifásico 400 V - 32 A - 50 Hz

Tabla 5.25. Características del arreglo de columnas cromatográficas de afinidad [78].

Finalmente, en la siguiente operación unitaria (columna AEX) se da en modo *batch* [77] ya que la purificación de las VLPs utiliza un arreglo de dos pasos en lugar del típico de tres pasos como se mostró en la etapa anterior (cromatografía de afinidad). Por lo tanto, esta columna tiene como propósito mejorar la captura y la selectividad. El permeado recolectado del paso anterior se transfiere directamente a la columna durante el paso de carga. En ese sentido, este paso de cromatografía utilizará una resina Q-Sepharose Fast Flow (QSFF) operando en modo de unión eluida. La resina Q-SFF es una resina de agarosa altamente reticulada con un grupo funcional cargado positivamente [45]. A continuación, se presenta la **Tabla 5.26** con características de la columna cromatográfica y de la resina.

Columna cromatográfica AEX Q-Sepharose Fast Flow (QSFF)	
Resina	<i>Q-Sepharose Fast Flow</i>
Volumen de la columna (L)	44 L
Altura (m)	0.125
Diámetro (m)	0.67
Velocidad lineal (cm/h)	60
Flujo volumétrico máximo (L/s)	211
Solución <i>buffer</i> de equilibrio (L)	264 L
Carga (L)	46.7 L
<i>Buffer</i> de lavado (L)	264 L
<i>Buffer</i> de elución (L)	110 L
<i>Buffer</i> para limpieza en el lugar (CIP)	176 L 2M NaCl, + 2M NaOH,
Lavado con agua (L)	396
Conductividad (mS/cm)	10±2
Temperatura (°C)	2-6

Tabla 5.26. Principales características de la columna AEX y de la resina.

A continuación, se presenta el balance de masas correspondiente a esta etapa en la **Tabla 5.27**.

Componente		Entrada (kg)	Salida (kg)	
		Carga	Desechos	Purificado
Sólidos	Biomasa residual	0.00	0.00	0.00
	Antígeno	0.46	0.01	0.45
	Desechos partícula grande	0.00	0.00	0.00
	Desechos partícula pequeña	0.00	0.00	0.00
Contaminantes solubles	HCP	0.01	0.002	0.008
	Otros	0.00	0.00	0.00
	Total	0.01	0.002	0.008
Solución <i>buffer</i> (A+B)		0.00	0.00	0.00
Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G) de cromatografía de afinidad		5.18	4.92	0.26
Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G+H) de cromatografía AEX		814.00	773.30	40.70
Masa total		819.65	778.23	41.42

Tabla 5.27. Balance de materia en columna cromatográfica AEX.

5.6.4. Diseño de etapa de concentración y acabado.

Dado que el flujo proveniente de la última etapa de cromatografía contiene considerables volúmenes y concentraciones de sales como cloruro de sodio (NaCl), el producto todavía no está listo para ser administrado. En ese sentido, en este paso la solución

buffer actual se cambia a una que contiene *tris* principalmente. Adicionalmente, el paso de ultrafiltración se realiza para concentrar primero la solución.

El proceso de ultrafiltración implica una filtración de flujo tangencial donde la corriente de filtrado fluye paralela a la superficie de la membrana (a diferencia de la microfiltración que es perpendicular). Esto significa que se debe de aplicar menos presión para que el ensuciamiento de la membrana sea lento debido a la acumulación de torta. Las membranas utilizadas para la ultrafiltración difieren de las de la microfiltración en que generalmente tienen tamaños de poro más pequeños y generalmente se miden como un límite de peso molecular [69]. El esquema correspondiente a esta etapa se presenta en la **Figura 5.9**.

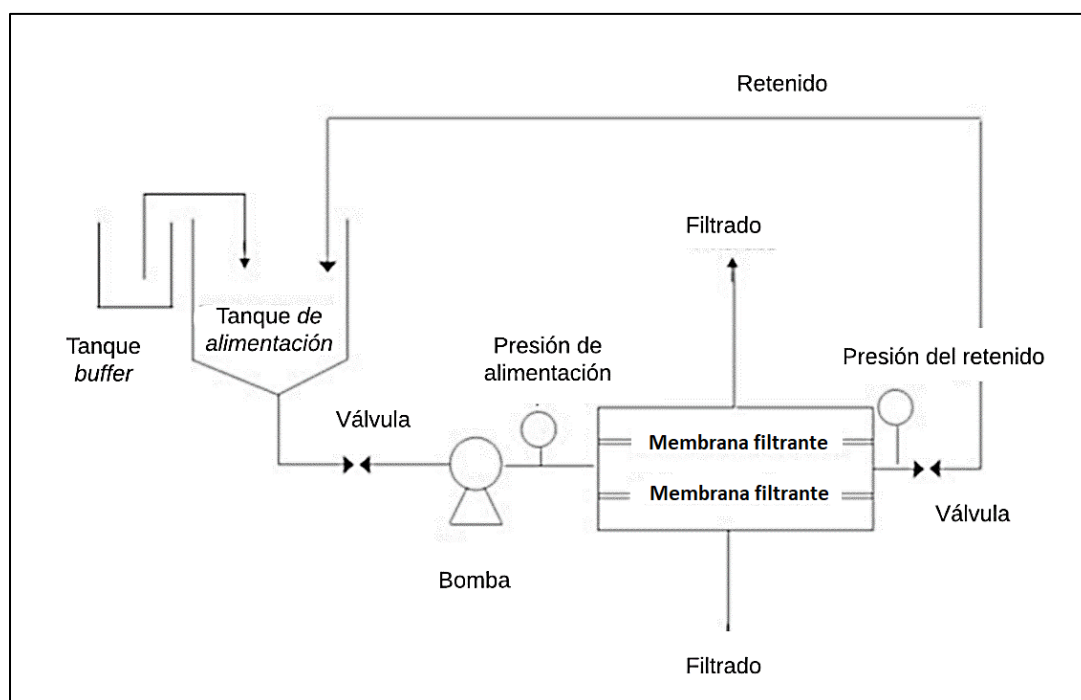


Figura 5.9. Esquema representativo de la etapa de UF/DF. Adaptado de [59].

En el paso de concentración, la alimentación se bombea a través de la membrana. Las moléculas más grandes, como la proteína producto, se retienen, mientras que las moléculas más pequeñas entran en la corriente de filtrado. Este proceso se puede utilizar para concentrar soluciones hasta 10 veces la cantidad de alimentación [59]. Aquí, se eligió un factor de concentración de 4, ya que en base a fuentes bibliográficas [84] la concentración de la

muestra de antígeno es menor a 20 g/L. Por otro lado, durante la etapa de diafiltración, la alimentación pasa a través del filtro con moléculas de agua y otras moléculas más pequeñas que pasan a la corriente de permeado. Sin embargo, ahora se agrega *buffer* para reemplazar el agua y las sales (que contienen la composición del *buffer* deseado).

En lo que respecta a la cantidad de *buffer*, esta depende del número de diavolumenes necesarios para el proceso de intercambio de solución. Un diavolumen es el equivalente al volumen de alimentación; por lo que, el aumento de diavolumenes significa que se reemplazará un porcentaje más alto de las sales originales. Las revisiones del protocolo han demostrado que aproximadamente 5 diavolumenes dan como resultado que más del 99% de las sales provenientes de la corriente de alimentación sean reemplazadas [52]. Así pues, los fabricantes también sugieren incluir un factor de seguridad de 2 diavolumenes, en base a esto tendremos un factor de diavolumen de 7 (que corresponde a un 99,9% de intercambio de *buffer*). Después de la concentración por un factor de 4, el volumen en el tanque de alimentación sería de alrededor de 27.5 L. Con 7 diavolumenes, el volumen de tampón necesario es 192.5 L.

En la **Tabla 5.28** se presenta el balance de materia para esta etapa de UF/DF.

Componente		Entrada (kg)		
		Carga	Retenido	Permeado
Antígeno		0.45	0.04	0.42
Sólidos	Desechos partícula grande	0.00	0.00	0.000
Contaminantes solubles	HCP	0.01	0.0003	0.0097
	Otros	0.00	0.00	0.00
Solución <i>buffer</i> (A+B)		0.00	0.00	0.00

Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G) de cromatografía de afinidad	0.26	0.01	0.25
Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G+H) de cromatografía AEX	40.70	2.03	38.67
Solución <i>buffer</i> (I+J) de UF/DF	356.50	17.82	338.68
Masa total	397.92	19.90	378.02

Tabla 5.28. Balance de materia en la etapa de concentración (UF/DF).

Luego de los resultados obtenidos, [59] menciona que el tamaño de poro utilizado para este paso tiene un corte de peso molecular de 30 kDa, el cual es aproximadamente 2 veces más pequeño que la proteína de interés. Generalmente, los fabricantes sugieren una diferencia de tamaño de 3-6 veces más pequeño respecto a la proteína producto [85]. En ese sentido, el 90% de las moléculas de mayor tamaño que el poro serán rechazadas, por lo que la retención de moléculas más grandes sea mucho mayor, y por lo tanto, se tenga una mayor pureza del producto [69]. La membrana a utilizar se basó en las membranas Cadence u Omega de Pall. La serie Cadence es de un solo uso, mientras que Omega se puede reutilizar. La ventaja de estos es que ambas son intercambiables. Las membranas de un solo uso pueden ser más económicas ya que no requieren limpieza y validación, especialmente cuando se procesan menos de 20 lotes por año [86]. Así pues, el área de la membrana utilizada fue la máxima de 2 m², pero para los cálculos, se aplicó un factor de seguridad de 1.25, por lo que el área efectiva estuvo más cerca de 2.5 m² [85].

En síntesis, para el sistema UF/DF, se adquirirá un equipo de la marca Pall de un solo uso como se muestra en la **Figura 5.10**. No obstante, en [59] se ha demostrado que el equipo Allegro TFF es rentable cuando se producen menos de 20 lotes al año. Asimismo, se tiene como ventaja adicional que las membranas de este equipo son compatibles con casetes (agrupaciones de membranas reutilizables). Por lo que, si los casetes Cadence de un solo uso son demasiado costosos, se pueden utilizar casetes Omega reutilizables. No obstante, será

necesario realizar una evaluación posterior en cuanto a la duración de estos, pues al ser equipos de un solo uso podrían desintegrarse y contaminar la muestra.



Figura 5.10. Sistema de UF/DF de la marca Pall (izquierda) y membranas en forma de *cassettes* Pall Cadence de un solo uso (derecha).

Posteriormente, como la corriente de alimentación tiene una concentración de aproximadamente 20 g/L, es necesario diluirla hasta una concentración final de 0.16 g /L. Según la cantidad de producto presente, se necesitarán alrededor de 2400 L de solución *buffer*, la cual será Tris 20 mM a pH 7.5 y se mezclará durante unas 6-12 horas a un ritmo lento. Se asume que el 99% de todos los componentes se trasladarán ya que habrá pérdidas en los volúmenes muertos en las tuberías. En la **Tabla 5.29** se presentan los balances de materia en esta etapa.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)	
	Alimentación	Pérdidas	Salida
Antígeno	0.42	0.01	0.41
HCP	0.0097	0.00	0.0097

Contaminantes solubles	Otros	0.00	0.00	0.00
Solución <i>buffer</i> (A+B)		0.00	0.00	0.00
Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G) de cromatografía de afinidad		0.25	0.23	0.02
Solución <i>buffer</i> (C+D+E+F+G+H) de cromatografía AEX		38.67	36.73	1.94
Solución <i>buffer</i> (I+J) de UF/DF		338.68	324.74	16.94
Solución <i>buffer</i> (J) dilución		2407.22	120.36	2286.86
Masa total		2407.22	479.08	2306.16

Tabla 5.29. Balance de materia en la etapa de dilución.

Ahora bien, como se requerirá una mezcla de 2500 L, se sugiere utilizar el tanque de dilución Mobius® Power MIX de Millipore, sus especificaciones se presentan en la **Tabla 5.30.**

Tanque de dilución Mobius Power MIX-2000	
Tanque	Acero inoxidable 304L
Dimensiones (LxA)	1620x1620 mm
Volumen mínimo de trabajo	200 L
Máxima presión de trabajo	10.3 bar
Temperatura de almacenamiento	0-40°C
Temperatura de operación	4-60°C

Tabla 5.30. Especificaciones del equipo de dilución *Mobius Power MIX*.

Luego, se procede a diseñar la etapa de filtración estéril donde se busca proporcionar una filtración final del producto para eliminar cualquier contaminante de origen microbiano que pudiera haber ingresado antes de las operaciones de llenado final. Como se filtra un gran

volumen de líquido, esto requerirá una gran superficie o tiempos de procesamiento más largos. Es probable que se haga una ponderación del costo-beneficio de tiempos más cortos frente a mayores costos de membrana para encontrar un punto óptimo. Debido a que esta es una operación simple en comparación con las operaciones anteriores, se aplicó un factor de rendimiento de 0.99 a cada componente en este proceso para que la pureza permanezca igual, pero se aplicará una pequeña pérdida debido a pérdidas en tuberías y fugas. En la **Tabla 5.31** se presenta el balance de materia de esta etapa.

Componente		Entrada (kg)	Salida (kg)	
		Alimentación	Pérdidas	Para formulación
Antígeno		0.41	0.02	0.39
Contaminantes solubles	HCP	0.01	0.00	0.01
	Otros	0.00	0.00	0.00
Soluciones <i>buffer</i>		2305.74	115.29	2190.45
Masa total		2306.16	115.31	2190.85
Pureza del producto		97.5%		

Tabla 5.31. Balance de materia en la etapa de filtración estéril.

En cuanto al paso de filtración, se aplicó un factor de seguridad de 1.2. El filtro elegido es un Opticap XLT 30 de 0.22 μm con un área de 2.1 m^2 . Se utilizarán dos filtros para dar un área total de 4.2 m^2 o 3.5 m^2 con el factor de seguridad aplicado. Según las cifras de Millipores para el XLT 30 que usa agua, se logró un caudal de hasta 70 L/min. Dado que la corriente de alimentación está muy diluida, se asume que se puede lograr a tener un caudal de 10 L/min en las mismas condiciones de presión (<1 bar) [87]. Esto daría un tiempo de proceso total de alrededor de 4 horas. Asimismo, será necesario un sistema de bombeo y dos tanques de recolección: la bomba debe tener una presión de al menos 2-3 bar en base a los balances de energía, mientras que el tanque de permeado debe tener un volumen de alrededor de 2000L.

Finalmente, la cantidad de antígeno final después del filtro estéril es de 391g a una concentración de 0.16 g/L debido al rendimiento de los equipos utilizados. Así pues, se espera que se pierda el 5% debido al rendimiento en la etapa de llenado, debido a fugas, volúmenes muertos y viales defectuosos. En la **Tabla 5.32** se presenta el balance de masas de esta etapa.

Componente		Entrada (kg)	Salida (kg)	
		Alimentación	Pérdidas	Salida
Antígeno		0.39	0.02	0.37
Contaminantes solubles	HCP	0.01	0.01	0.00
	Otros	0.00	0.00	0.00
Solución buffer	Total	2190.45	109.52	2080.93
Masa total		2190.85	109.55	2281.30

Tabla 5.32. Balance de materia en la etapa de acabado.

Debido a los requisitos de llenado de vacunas [7], se utilizará un 10% adicional de producto por dosis, dando un número de dosis de 89.9 millones de dosis por lote, como se aprecia en la **Tabla 5.33**.

Acabado	
Antígeno (g)	371
Cantidad de antígeno por dosis (g)	3.75×10^{-6}
Adicional	10%
Tamaño de dosis con adicional (g)	4.125×10^{-6}
Dosis por lote	89 939 394

Tabla 5.33. Dosis por lote luego de la etapa de acabado.

Debido al gran número de dosis por lote, puede ser difícil encontrar un equipo para ello. No obstante, debido a la estabilidad del producto, es posible extender la operación de llenado en el proceso, permitiendo que los lotes del producto a granel se retiren del almacenamiento. Aquí es importante definir que cada vial contará con 5 dosis de vacunas de partículas similares a virus junto con 1.25 mL de adyuvante (ASO₃, que se produce en otro lugar, se recibe y almacena en tanques cerca de la operación de llenado). En ese sentido, se

necesitarán llenar 17 987 879 viales por lote, y basados en el equipo de llenado Bosch FXS 5100 con una tasa de 36 000 viales/ hora, serán necesarias 500 horas para finalizar esta operación.

5.6.5. Diseño de equipos auxiliares.

En cuanto a los equipos auxiliares, se presenta la **Tabla 5.34** con el catálogo utilizado y la justificación para su selección.

	Selección	Funcionalidad
TK-101	Tanque convencional de acero inoxidable con 6 m ³ de capacidad.	Para almacenar el producto concentrado proveniente de la etapa de ultrafiltración (operación por lotes).
V-101	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	Las válvulas son ubicadas estratégicamente para regular el flujo que pasa por las tuberías. Asimismo, debido a su simplicidad para el manejo manual por parte de los operarios de planta.
V-102	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	
V-103	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	
V-104	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	
V-105	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	
V-106	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	
V-107	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2”.	

V-108	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2".	
V-109	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2".	
V-110	Válvula de globo Fisher [88] con tubería de 2".	
P-101	Bomba peristáltica en línea de rotor seco simple con potencia de 5 kW.	Brinda la potencia necesaria para elevar la presión hasta la entrada del homogeneizador.
P-102	Bomba peristáltica en línea de rotor seco simple con potencia de 1.5 kW..	Debido a la facilidad de manejo y mantenimiento que presenta en comparación a otro tipo de bombas (dobles). Asimismo, ofrecen un caudal preciso, estable y constante que permite transferir medios delicados con porcentajes de sólidos sin alterar su concentración [89].
P-103	Bomba peristáltica en línea de rotor seco simple con potencia de 1.5 kW.	
P-104	Bomba peristáltica en línea de rotor seco simple con potencia de 1.5 kW.	
P-105	Bomba peristáltica en línea de rotor seco simple con potencia de 1.5 kW.	
P-106	Bomba peristáltica en línea de rotor seco	

	simple con potencia de 1.5 kW.	
E-101	Intercambiador de calor de placas de níquel de marca AIC [90].	Debido a la diferencia de temperaturas entre las corrientes, y a que ocupa un menor espacio en comparación a otros arreglos. Aquí, es importante mencionar que se empleará agua a temperatura ambiente para realizar el intercambio de energía.
E-102		

Tabla 5.34. Selección de equipos auxiliares.

5.7. Construcción del PFD.

En la **Figura 5.11**, se presenta el PFD realizado para el proceso propuesto en el trabajo de tesis, el cual considera desde la etapa aguas arriba hasta la etapa de concentración y acabado incluyendo los equipos auxiliares.

Es importante mencionar que, en el homogeneizador de alta presión (H-101) se contempla dentro del equipo un sistema de calentamiento mediante resistencias que está ya asociado al costo del equipo. Asimismo, en cuanto al producto obtenido luego de la etapa de concentración y acabado, este pasa luego por controles de calidad asociados a productos biofarmacéuticos para ser utilizados en humanos. En el Anexo 12, se presenta el PFD completo incluyendo la etapa *upstream*.

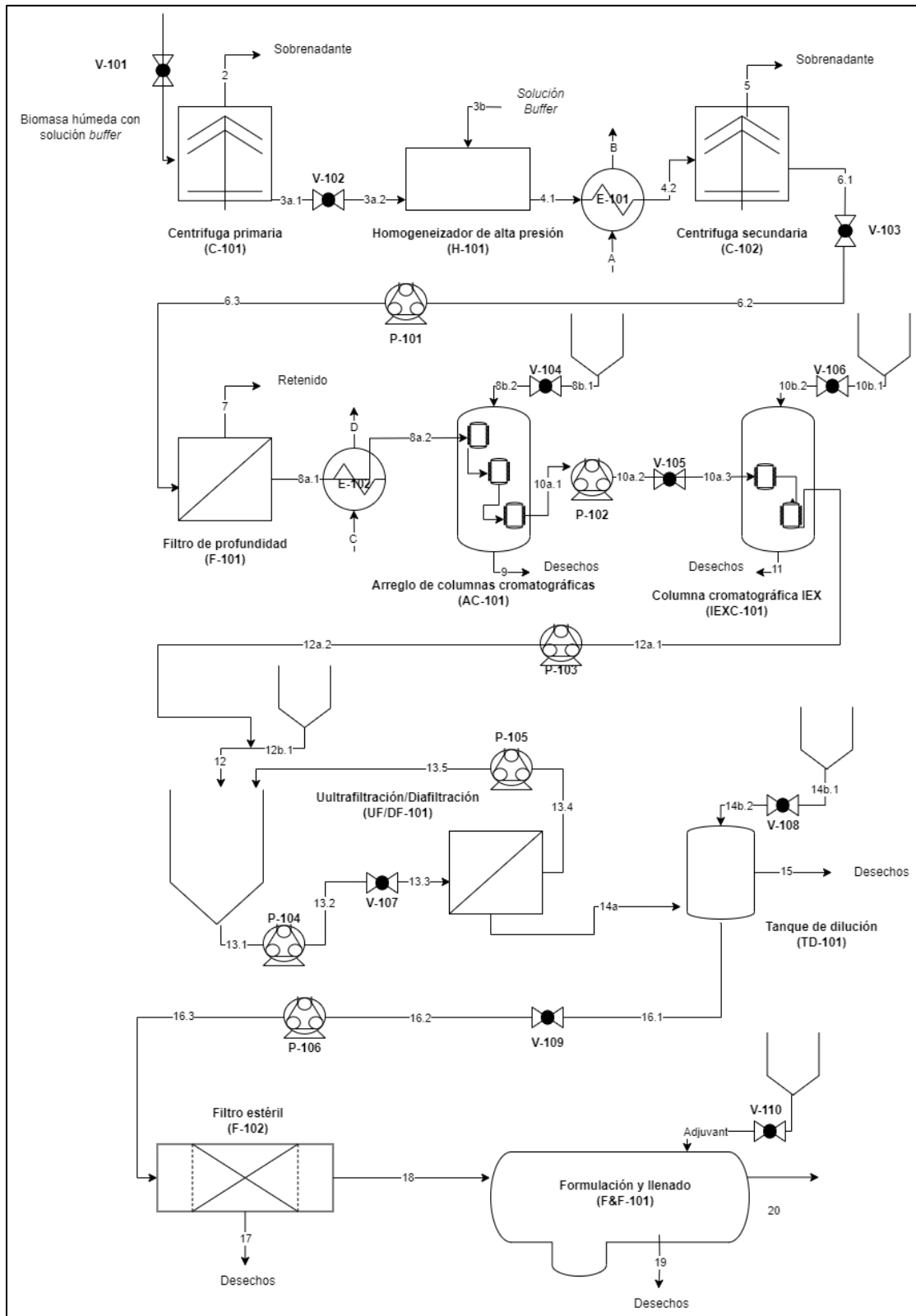


Figura 5.11. PFD del proceso propuesto incluyendo la etapa aguas arriba y la etapa de acabado.

5.8. *Scheduling* del proceso.

Para determinar el número de lotes que se producen al año en el proceso propuesto, el cual inicia con la centrifugación primaria y termina con la etapa de formulación y llenado, se realizó un *scheduling*. Esta actividad consistió en identificar en que instante se comienza a producir otro lote considerando la disponibilidad de los equipos, los tiempos de carga y descarga y la limpieza de cada uno de estos. A continuación, se presentan las consideraciones:

- Teniendo en cuenta los pequeños retrasos y el movimiento de material entre las etapas, se considera un error del 20% en el proceso.
- Los tiempos de limpieza en el proceso se asumen como 17 horas adicionales. Sin embargo, estos procesos se pueden completar mientras la siguiente etapa está en curso y se pueden superponer.
- Las etapas de cromatografía se calcularon utilizando el caudal obtenido de la sección anterior y se utilizó el volumen de cada corriente.
- El volumen de la etapa de UF/DF se calculó restando el exceso de volumen (ya que el volumen se reduce 4 veces inicialmente) y luego multiplicando el volumen concentrado por 7 para obtener el volumen de *buffer* requerido.

Posteriormente, para realizar el *scheduling* del proceso, se consideraron 14 actividades, las cuales se presentan en la **Tabla 5.35**. En dicha tabla también se reporta el tiempo y equipo necesario para cada actividad. [52]

Etapa	Equipo	Carga (L)	Flujo volumétrico (L/h)	Tiempo (h)
Centrifugación primaria	C-101	2986.87	940	3.18
Homogeneización	H-101	3041.68	912	3.34
Centrifugación secundaria	C-102	2810.88	940	2.99
Filtración de profundidad	F-101	Calculado en Ec. 70		1.93
Cromatografía de afinidad	AC-101	Calculado base a la Tabla 5.22, considerando los 4.55 ciclos necesarios para procesar la carga de entrada al arreglo cromatográfico.		10.29
Cromatografía AEX	IEXC-101	684.7	211.2	3.24
UF/DF	UF/DF-101	397.5	109.2	3.64
Dilución	TD-101	Se asume de acuerdo a [91]		12
Filtración estéril	F-102	2286.8	600	3.81
Terminación y llenado	F&F-101	Calculado en la sección 5.6.4		500
Tiempos de limpieza	Se asume de acuerdo a [91]			17
Total				561.42

Tabla 5.35. Lista de actividades y sus detalles para fines del *scheduling*.

En ese sentido, el tiempo necesario por cada lote será de 561.42 horas. No obstante, tal como se mencionó en las consideraciones, teniendo en cuenta los pequeños retrasos y el

movimiento de material entre las etapas, se considera un error del 20% en el proceso. De modo que, se necesitarían 673.70 horas o 28 días aproximadamente por lote (incluyendo las perdidas mencionadas en las consideraciones), lo que equivale a 11 lotes por año. Finalmente, es importante destacar que, dada la disponibilidad de materia prima y tal como lo sugiere [59], cuando las etapas *upstream* y *downstream* se procesan separadamente, se considera un margen de seguridad del 25%. Por lo que, 8 lotes serán considerados como producción anual en los posteriores cálculos.

Posteriormente, debido a que la formulación y llenado de viales es la etapa limitante del proceso, se propone un arreglo quintuplicando el número de equipos de acabado obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 5.12**.

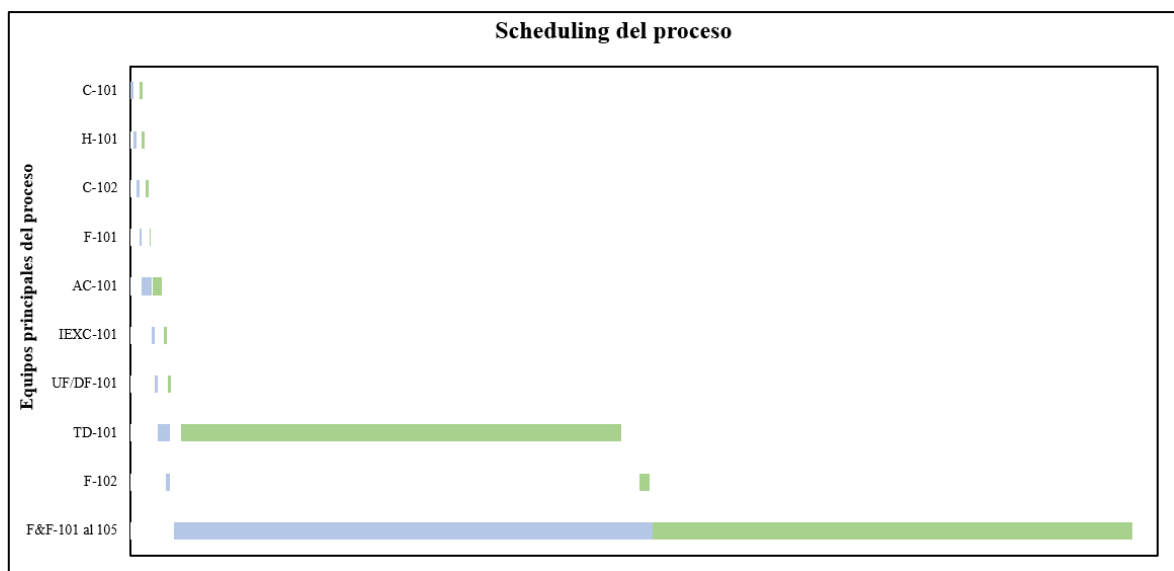


Figura 5.12. Scheduling para el caso con 5 equipos de formulación.

A partir de la nueva secuencia propuesta, se determinó que se logró a reducir el tiempo por lote a 161.40 horas o 6 días aproximadamente, lo que equivale a 55 lotes por año. Esto, representa un incremento en la producción de aproximadamente 4 veces más el valor inicial. No obstante, el incremento de equipos de acabado contrarresta la producción anual, debido a que, al tener una mayor cantidad de estos, el CapEx del proceso sería mayor, impactando finalmente al costo unitario de producción por vial.

5.9. Evaluación de seguridad del proceso en base a las BPM.

En lo que respecta al análisis de seguridad del proceso, es importante reconocer que una instalación biofarmacéutica es un área compleja en la que múltiples operaciones y procesos se llevan a cabo. La instalación atiende todas y cada una de las operaciones, desde la producción primaria hasta los procesos auxiliares, de una manera que permite la producción óptima del producto. Por lo tanto, el diseño de la instalación debe realizarse de tal manera que se controle cada aspecto del ambiente de producción para proteger el producto y optimizar la utilización del espacio. Para lograr esto, se debe prestar especial atención al flujo del proceso, flujo de materiales, flujo de personal y flujo de desechos dentro del proceso. El uso de barreras debe asegurar la separación dentro de la instalación para reducir riesgo de contaminación, lo cual permite la creación de una instalación que cumpla con las buenas prácticas de fabricación (BPM).

En ese sentido, se consideran 4 aspectos generales que, desde un punto de vista regulatorio, garantizan la seguridad del producto y del personal minimizando los riesgos para la seguridad pública.

- Los equipos deben limpiarse continuamente antes de iniciar un nuevo lote o al hacer algún cambio en los parámetros del proceso.
- Se deben mantener registros de todos los equipos principales. Esto debe incluir el uso del equipo, la limpieza, la esterilización y los productos/materiales a los que ha estado expuesto.
- Los procedimientos de limpieza deben estar completamente validados y monitoreados constantemente de acorde a las BPM para garantizar que los procedimientos cumplan con los requisitos mínimos en todo momento.
- Los artículos que no se utilizan deben transportarse y almacenarse de manera que se limite cualquier riesgo de contaminación o daño.

Asimismo, en la instalación deben considerarse pasillos y puertas de tamaño adecuado dentro de la instalación para permitir el movimiento del equipo. Se deben establecer un conjunto de protocolos para garantizar que los equipos grandes se muevan de manera segura

y sean operados por el personal capacitado. Los equipos grandes también deben trasladarse fuera del horario de trabajo habitual para proteger aún más al personal.

La creación de una instalación de esta naturaleza tiene numerosas implicaciones para la distribución y el diseño. El diseño debe tener en cuenta todas y cada una de las necesidades de procesamiento actuales y futuras que puedan ser necesarias. Estos se diseñarán para permitir la entrada y salida de diferentes plataformas, la instalación de divisores creando barreras físicas dentro del espacio de trabajo y los servicios públicos que se pueden enviar a diferentes posiciones. Ambos espacios deberán tener tasas de flujo de aire estéril y presiones estrictamente controladas. Asimismo, es importante tener en cuenta además de las consideraciones físicas, también las consideraciones de procedimiento como la capacitación del personal en los cambios de turnos, la configuración y la supervisión de los equipos.

A continuación, se identifican las operaciones unitarias del proceso propuesto en base a los grados de riesgo según las buenas prácticas de manufactura en la **Tabla 5.36**.

Clasificación de riesgo	Descripción según las BPM	Operaciones unitarias del proceso
Grado A	Operaciones de alto riesgo en las que se deben cumplir las condiciones asépticas del producto.	Etapa <i>upstream</i> Formulación y llenado
Grado B	Alrededores para la zona de grado A	Almacenamiento del producto
Grado C	Preparación de material para procesos posteriores.	Proceso <i>downstream</i> (extracción, clarificación, purificación y acabado del producto)
Grado D		Tratamiento de equipos. Área de lavado. Preparación de soluciones <i>buffer</i> .

Sin clasificación	No presentan riesgos biológicos	Almacenamiento del material
--------------------------	---------------------------------	-----------------------------

Tabla 5.36. Riesgos asociados a las etapas del proceso según grados estipulados por las BPM para procesos biofarmacéuticos.

El área más crítica de la instalación es la formulación y llenado, en lo que respecta a las normas de bioseguridad del proceso. El entorno de acabado del producto no puede verse comprometido y prácticamente todos los contaminantes deben erradicarse. El producto en esta etapa es más valioso y, por lo tanto, esta zona será de grado A. El almacenamiento del producto será una zona de grado B debido a la proximidad al área de formulación y llenado. El riesgo de contaminación es menor, lo que anula la necesidad de una zona de Grado A.

Según la legislación nacional vigente, es necesario que la instalación tome precauciones contra los riesgos que presentan los equipos, agentes biológicos y otros peligros para los empleados, el público y el medio ambiente. Para el Perú, estas regulaciones son dictadas por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y el Ministerio de Salud (MINSa).

5.9.1. Implementación de una estrategia de seguridad.

Es necesario identificar los riesgos presentes, examinar las estrategias de mitigación y luego elegir una recomendación. A continuación, en la **Figura 5.13** se muestra una estrategia general para hacer frente a cualquier tipo de riesgo.

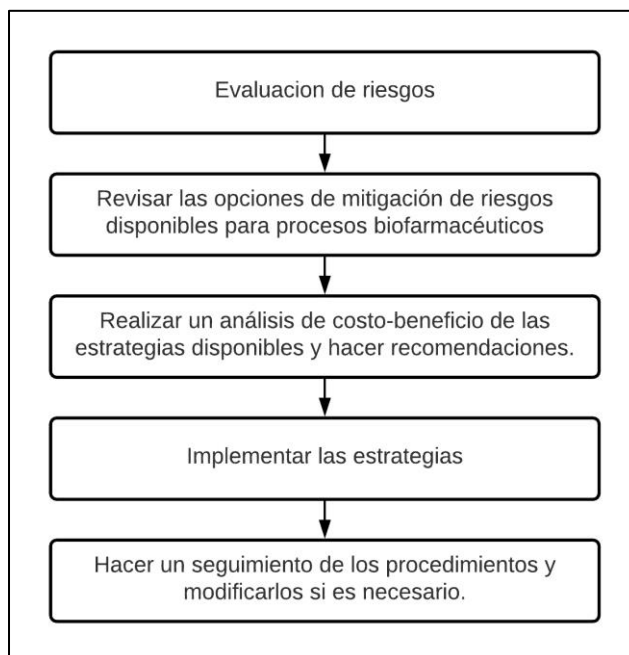


Figura 5.13. Estrategia general para el análisis de seguridad del proceso.

Posterior a ello, se muestra la **Tabla 5.37** con los riesgos asociados en cada etapa referente al proceso.

Etapa	Peligro	Riesgo	Severidad	Probabilidad	Medidas de control	Equipos de protección personal
Procesamiento aguas arriba	Expresión del gen viral antígeno en <i>nicotiana benthamiana</i> .	Exposición a riesgos biológicos	5	3	Contención en contenedor primario o secundario, manejo efectivo del aire, filtrado de gases de escape y prevención de fallas catastróficas para detener fugas.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.
Centrifugación	Aerosolización.	Contaminación con fragmentos de virus que pueden estar en el aire.	5	3	Se deben utilizar métodos de ventilación y captura durante la descarga de la centrífuga para minimizar la liberación de aerosoles.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.
	Altas velocidades del rotor.	Ruptura del recipiente y cortes por fragmentos desprendidos.	5	2	Lecturas constantes de velocidad de múltiples sensores y se vincularán a cortes automáticos o alarmas.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.

	Empleo de altas temperaturas y fricción.	Deshidratación, trastornos que provocan fatiga. Piezas del equipo propulsadas.	3	2	Se debe purgar la centrífuga con N ₂ y utilizar un sistema de inundación de N ₂ para mantener la contención primaria por debajo del nivel de concentración mínima de oxígeno. Mantener a la centrífuga aislada y utilizar amortiguadores.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.
Homogeneización de alta presión	Empleo de altas presiones y temperaturas.	Deshidratación, trastornos que provocan fatiga. Piezas del equipo propulsadas.	3	2	Contar con un sistema de suministro de agua de emergencia. Aislamiento y protección de estructuras. Equipos contra incendios.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes.
	Liberación de calor	Quemaduras en la piel.	3	4	Empleo de equipos de protección personal y provisión de equipo de extinción de incendios.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes.

	Impulsor del sistema de agitación	Cortes en la piel.	4	3	Buena distribución entre operaciones. Empleo de equipos de protección personal.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes.
	Operación y mantenimiento.	Los trabajadores pueden sufrir golpes contra tuberías o cualquier otra parte sobresaliente de la estructura. Exposición al ruido	3	3	Adecuada iluminación y distribución de equipos con gran volumen.	Batas, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.
Filtración de profundidad	Empleo de presiones elevadas.	Piezas del equipo propulsadas.	3	2	El filtro se debe diseñar de manera que se minimice la acumulación de torta con sensores de presión y medidores de flujo instalados. La inspección visual de la carcasa para detectar	Batas, gafas, mascarillas respiratorias, guantes.

					cualquier signo de grietas o fugas será parte del protocolo.	
Cromatografía y etapas de acabado del producto.	Empleo de presiones elevadas.	Piezas del equipo propulsadas.	3	2	Se debe comprobar la carcasa de la columna en busca de grietas antes de iniciar cualquier etapa de cromatografía y se realizarán pruebas de fugas con caudalímetro/monitorización de presión. La tubería que se conecta a la bomba estará protegida para garantizar que pueda soportar las altas presiones.	Batas, gafas, mascarillas respiratorias, guantes.
	Exposición a sustancias químicas peligrosas.	Quemaduras en la piel	4	3	Limitar la exposición a productos químicos empleados en cada etapa del proceso y contar con estaciones de lavado cercanas para emergencias.	Batas, gafas, mascarillas respiratorias, guantes.

Tabla 5.37. Peligros y riesgos asociados al proceso de recuperación de vacunas de VLPs para la COVID-19.

Luego de la identificación de peligros y riesgos asociados al proceso, se muestra una descripción general de los requisitos de contención y su implementación básica que pueden ser necesarios en el proceso en la **Tabla 5.38**.

Medida de contención.	Requisitos.	Implementación.
Aislamiento de organismos viables del lugar de trabajo y el medio ambiente.	Se llevará a cabo para cumplir con las BPM y los requisitos de seguridad.	Contención de operaciones unitarias, y transferencia de productos a través de tuberías. Manejo mínimo por parte del operario.
Sistemas cerrados dentro de un área controlada.	No requerido pero implementado (requisito de las BPM).	Corredor de suministro y retorno utilizado para tráfico de un solo sentido. Las habitaciones individuales se sellarán para actuar como contención secundaria.
Control de aerosoles durante la eliminación o adición de materiales al sistema cerrado.	Implementado mediante el uso de múltiples niveles de contención y filtrado de aire.	Vaporización de puertos antes/después de la operación de la unidad. Uso de sistemas de sellado adecuados en su lugar (con fluidos de barrera y vaporización).
Señales de riesgo biológico.	Implementado con otra señalización también (requerido).	Se colocará en lugares apropiados.
Superficies resistentes a la degradación por el agua y otros productos químicos de uso habitual y fáciles de limpiar.	No requerido pero implementado (requisito de las BPM).	-

Ventilación de áreas controladas.	No requerido pero implementado (requisito de las BPM).	Implementación de un sistema de aire.
Acceso restringido.	Implementado (se requiere según las BPM, de clase 2)	Implementado para todas las salas de proceso y para el área de fabricación de la instalación (2 niveles de acceso).
Instalaciones de descontaminación.	Requerido.	Se proporcionarán duchas y lavados de manos especializados.
Ducha obligatoria después de salir de un área controlada.	No requerido.	Se proporciona ducha opcional (pero no es necesaria en condiciones normales de funcionamiento).
Ropa de equipo de protección personal.	Implementado (requerido por seguridad según las BPM).	Se espera un cumplimiento estricto y proporcionado.
Registros de la formación del personal y del protocolo.	Implementado, aunque no requerido.	Se llevará a cabo para dar inicio al proceso.

Tabla 5.38. Descripción general de las medidas de contención y su implementación luego de la identificación de peligros y riesgos en el proceso.

De la tabla anterior, es necesario mencionar que los operadores también serán capacitados y se espera que planteen preocupaciones de seguridad si lo consideran oportuno en el desarrollo del proceso [7].

5.10. Evaluación económica del proceso.

5.10.1. Estimación del CapEx asociado al proceso.

Con el objetivo de estimar el costo de los equipos y otros costos asociados al proceso, se asumieron las siguientes consideraciones:

- Algunos de los precios de los equipos que figuran en la Tabla 5.39 se obtuvieron mediante entrevistas con empresas biofarmacéuticas que están usando el equipo o a partir de reportes científicos de análisis económico de procesos similares.
- Algunos de los precios de los equipos se obtuvieron para años anteriores, pero se factorizaron al precio de 2019 utilizando el índice de costos de plantas de ingeniería química (CEPCI).
- Los precios de otros equipos se obtuvieron directamente del fabricante, la base de datos *Biosolve* y el folleto MBI sobre diseño de bioprocesos y evaluación económica.

Luego de ello, se presenta la **Tabla 5.39** con la determinación del CapEx asociado al proceso.

Etapa del proceso.	Equipo propuesto.	Capacidad	Unidades.	Costo total (US\$)	Referencias.
Aspectos generales del proceso.	<i>Biosafety cabinet</i>	-	1	16 001.70	[92]
	Almacenamiento de biomasa para ingreso al proceso <i>downstream.</i>	1 m ³	1	52 360.44	[92]
Extracción.	Centrifuga de discos primaria.	-	1	15 906.04	[72]
	Homogeneizador de alta presión (Microfluider M-700).	74 x 180 x 145 cm	1	404 687.16	[92]
	Tanque de dilución	2000 L	1	10 341.83	[92]
Clarificación.	Centrifuga de discos secundaria.	-	1	15 906.04	[72]
	Filtro de profundidad.	1.6 m ²	1	39 765.10	[93]
Purificación.	Columna cromatográfica de afinidad.	103.62 L	1	6 298 800.75	[92]
	<i>Skid</i> de columna cromatográfica de afinidad ProSep®.	-	1	373 188.20	[92]
	Columna cromatográfica de intercambio aniónico glass.	10 L/min	1	46 781.33	[92]
	AKTA Vant 500	-	2	202 587.88	[92]

	<i>Skid</i> de columna cromatográfica de intercambio aniónico BPG 450/750.	46 L	1	266 563.00	[92]
Concentración y acabado del producto.	UF/DF incluido <i>skid</i> .	2.5 m ²	4	898 760.10	[92]
	Tanque de dilución.	2000 L	3	201 310.00	[92]
	Filtro estéril.	1.6-11.2 m ²	1	39 765.10	[92]
	Sistema de llenado de viales Bosch FXS 5100.	-	1	5 311 698.25	[92]
	Tanque de retención del adyuvante.	300 L	1	48 649.94	[92]
Almacenamiento de soluciones <i>buffer</i> .	Recipiente de almacenamiento (acero inoxidable).	1000 L	12	624 874.29	[92]
Cuarto de lavado.	Maquina lavadora.	-	1	382 275.12	[92]
	Autoclave.	250 L	1	322 428.65	[92]
Almacenamiento del producto & otros.	Cámara frigorífica con estantes.	223 x 203 x 203 cm	1	6 893.94	[92]
	Tanque de recolección de residuos.	10 m ³	1	81 916.10	[92]

	Tanque de almacenamiento de agua esterilizada para el sistema de formulación.	4 m ³	3	199 900.25	[92]
	<i>Single Used Bag support</i> para el filtro de profundidad y UF/DF.	200 L	2	1 524.74	[92]
	Congelador.	-	1	14 422.80	[92]
	Esterilizador.	5 000 L	2	265 000.64	[92]
	Bombas.	-	6	4 533.22	[92]
	Válvulas	-	10	100.00	
	Intercambiadores de calor.	-	2	69 229.43	[92]
	Muebles y estanterías.	-	1	26 510.06	[92]
Total				16 242 682.10	

Tabla 5.39. Costos de compra de los equipos asociados al proceso de producción de VLPs.

Luego de determinar que el costo total de los equipos (PC) para el proceso propuesto es de 16 242 682.10\$ se calcularon los costos directos (DC), los costos indirectos (IC) y otros costos (OC) asociados al proceso. Para lo anterior, se empleó la Tabla A5.1 del Anexo 5. Los resultados se presentan en la **Tabla 5.40**.

Tipo de costos	Costos asociados	Costo (US\$)
Costos directos (DC)	Equipos auxiliares.	3 248 536.42
	Instalación.	8 121 341.05
	Tuberías.	6 497 072.84
	Instrumentación.	5 684 938.74
	Aislamiento.	487 280.46
	Sistemas eléctricos.	2 436 402.32
	Instalaciones.	7 309 206.94
	Mejora del terreno.	2 436 402.32
	Instalaciones auxiliares.	8 121 341.05
	Total (DC)	44 342 522.13
Costos indirectos (IC)	Ingeniería.	4 060 670.52
	Construcción.	5 684 938.74
	Total (IC)	9 745 609.26
Costos de capital fijo u otros costos (OC)	Honorarios del contratista.	812 134.11
	Contingencia	1 624 268.21
	Total (OC)	2 436 402.32
Total de la inversión de capital fijo (FCI)		72 767 215.81

Tabla 5.40. Costos directos (DC), costos indirectos (IC) y otros costos (OC) asociados al proceso.

En ese sentido, una vez calculada la inversión de capital fijo como la suma de los componentes de la Tabla 5.40, se procedió a determinar el capital de trabajo tomando en consideración que este representa el 15% del FCI. Así se obtuvo un valor de 10 915 082.37 US\$ para el capital de trabajo y un valor de **83 682 298.18 US\$** para el CapEx. Finalmente, asumiendo que la economía peruana es más similar a la de Brasil (1.14) y asociando al factor

de actualización para el año 2019 $\left(\frac{607.5 \text{ (cost index in year A)}}{478.6 \text{ (cost index in year B)}}\right)$, se tiene un **CapEx de 121 091 048.07 US\$**

5.10.2. Estimación del OpEx asociado al proceso.

Para calcular los costos de operación (OpEx), se determinaron los costos variables (costos de materia prima, costo de adyuvante, costo de comercialización y distribución, servicios públicos, servicios de contrato de validez y utilidades) a partir de los balances de materia y energía del proceso en base al año 2019. En la **Tabla 5.41** se muestran los resultados, considerando que el precio de los medios y las soluciones *buffer* se calculó en función de sus componentes (no se muestran los detalles).

Materia prima	Cantidad	Costo (US\$)	Referencias
Resina de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose Fast Flow)	44 L	93 915.66	[92]
Resina de la etapa de cromatografía de afinidad.	103.62 L	466 812.48	[92]
Cápsulas del filtro de profundidad.	1 cápsula de 1.6 m ²	4 037.99	[92]
Filtro estéril (Opticap XLT30)	1 con una membrana de 2.5 m ²	14 611.14	[92]
Cleaning-in-place (CIP) con NaCl	258 L	699.63	[92]
Cleaning-in-place (CIP) con NaOH	258 L	301.35	[92]
Cleaning-in-place (CIP) con isopropanol al 30%	172 L	439.34	[92]
Membrana de la etapa de UF/DF	1	8 190.63	[92]
Solución <i>buffer</i> de 50mM NaCl - 10mM Tris pH 8.0	4 000 L	4 139.42	[92]

Solución <i>buffer</i> de 8M Urea 10mM Tris pH 7	13 L	483.10	[92]
Solución <i>buffer</i> de 8M Urea 90mM NaCl 20mM Tris propano	216 L	9 226.82	[92]
Solución <i>buffer</i> de 8M Urea 50mM NaCl 20mM Tris propano	516 L	22 111.29	[92]
0.1 M NaOH	24.3 L	16.10	[92]
0.33M NaOH 6mM Na ₃ PO ₄ <i>buffer</i>	146 L	110.30	[92]
20mM Tris Buffer pH 7.5	4000 L	6 472.55	[92]
<i>Hold bag</i> (12)	1000 L	8 841.06	[92]
Adyuvante	2 \$/vial	35 975 757.60	[92]
<i>Nicotiana benthamiana</i> (se considera el costo de las semillas procesadas en laboratorios especializados donde se puede llevar a cabo el proceso agua arriba)	371 g	3 607 005.75	[92]
Viales	17 987 879	62 568 474.60	[92]
Total		102 791 646.81	

Tabla 5.41. Costos de materia prima por lote.

Para el cálculo asociado al costo de las utilidades se considera el agua de refrigeración, la energía eléctrica y el aire que se alimenta a los filtros y compresores para la esterilización como un 2% del FCI según [94]. Asimismo, se incluyen el manejo de residuos sólidos y efluentes del proceso. Los residuos sólidos corresponden a la biomasa retenida en las diferentes etapas del proceso, mientras que para los efluentes se considera el agua residual y soluciones *buffer* en las corrientes de desechos. De este modo, se presenta la **Tabla 5.42** con los costos variables asociados al proceso por cada lote.

Tipo de costos	Costos asociados	Cantidad	Costo unitario	Costo (US\$)
Variables	Utilidades (consumo energético y esterilización de equipos)	-		1 059 138.025
	Tratamiento de efluentes	6 004.15 L	450.00 \$/L	2 701 867.50
	Manejo de residuos sólidos	599.60 kg	803.40/kg	481 718.96
	Total			4 236 552.10

Tabla 5.42. Costos variables asociados al proceso por lote.

Consecuentemente, se procede a determinar los costos fijos con las consideraciones presentadas en la Tabla A.6.1 en el Anexo 6. Para el cálculo del costo de mano de obra se consideraron 38 operadores en cada turno de 8 horas (se consideran tres turnos diarios) durante 330 días laborables en todo el año, con lo cual se obtuvo una demanda anual de 300 960 horas-hombre [65]. El costo de los laboratorios de control de calidad se aproximó como el 15% del costo total de mano de obra como se aprecia en la **Tabla 5.43**.

Costos asociados	Costo (US\$)
Mantenimiento de los equipos	2 350 369.72
Seguros	1 052 965.64
Impuestos locales	2 105 931.27
Mano de Obra (incluye beneficios, supervisión, suministros y gastos)	4 153 248
Distribución y marketing	7 826 731.17
Investigación y Desarrollo	3 913 365.59
Laboratorios de control de calidad	622 987.20
Total	22 025 598.59

Tabla 5.43. Costos fijos de operación.

Así pues, el OpEx del proceso asciende a un valor de **878 251 189.88 US\$**. Finalmente, para calcular la depreciación de los equipos, se utiliza el método de *straight-line*. Para ello, se consideró un período de depreciación de 5 años y se calculó la depreciación del año 2 al

año 6 dividiendo el costo de un activo y su valor esperado por la cantidad de años que se espera que usar como lo sugiere [49]. Los resultados de estos cálculos se presentarán más adelante junto a los índices de rentabilidad del proyecto.

5.10.3. Estimación del costo unitario de producción

El costo unitario de producción fue calculado en función al CAPEX y OPEX del proceso, así como a la producción anual de dosis de vacuna empleando la ecuación 22. Estos resultados se muestran en la **Tabla 5.44**.

Costo total de producción anual (US\$/año)	999 342 237.94
Masa de producto por lote (kg de proteína /lote)	0.371
Lotes producidos por año (lotes/año)	8
Costo unitario de producción (US\$/kg proteína)	336 705 605.78
Costo unitario de producción (US\$/vial)	6.84

Tabla 5.44. Estimación del costo unitario de producción.

Si bien, el costo unitario calculado es menor al precio de venta de dosis de vacuna contra la COVID-19 en la actualidad, el cual suele variar entre 2 y 20 dólares [95], es posible disminuir el costo realizando modificaciones en el *scheduling* del proceso o buscando estrategias de mejora del nivel de expresión de la planta.

5.10.4. Cálculo de índices de rentabilidad del proyecto (VAN y TIR).

Antes de invertir una cantidad de dinero en la construcción de una planta química, se debe verificar mediante proyecciones que el proyecto propuesto represente el menor riesgo posible. En ese sentido, se procede a determinar el VAN y el TIR por ser índices de rentabilidad del proyecto.

Durante el proyecto, el efectivo inicialmente sale de la empresa para pagar los costos de ingeniería, adquisición de equipos, construcción de la planta y puesta en marcha de la misma. Una vez que la planta está construida y comienza a operar, los ingresos por la venta

del producto comienzan a fluir hacia la empresa [96]. En tal sentido, se procederá a realizar un flujo de caja, que contempla la diferencia entre los ingresos y los gastos del proyecto. En primera instancia, se realizan las consideraciones económicas pertinentes para el tipo de proceso a implementar.

Cada lote produce 17 987 879 viales de vacunas de VLPs, y considerando que se puede producir 1 lote en 28 días, se pueden procesar aproximadamente 11 lotes por año (tomando en consideración 330 días laborales). Sin embargo, solo el 75% de este número (8 lotes por año) se considera para el flujo de caja proyectado. Considerando 7 US\$ por vial como costo de venta, anualmente se obtienen 125 915 153 US\$ por la venta de vacunas de VLPs. La **Tabla 5.45** muestra el cálculo de la ganancia bruta anual.

Año	Ganancia bruta (US\$)	Cargo de depreciación (US\$)	Ingresos (US\$)	Tasas (US\$)	Flujo de caja (US\$)
0	-	-	-	-	-121,091,048.07
1	129 070 034.12	24 218 209.61	104 851 824.51	30 931 288.23	98 138 745.89
2	128 945 436.68	24 218 209.61	104 724 227.07	30 894 531.99	98 050 904.70
3	128 817 101.32	24 218 209.61	104 598 891.71	30 856 673.05	97 960 428.27
4	128 684 915.90	24 218 209.61	104 466 706.28	30 817 678.35	97 867 237.54
5	128 548 764.91	24 218 209.61	104 330 555.30	30 777 513.81	97 771 251.10

Tabla 5.45. Resultados del análisis económico del caso de estudio.

Posterior a ello, se calculó que el VAN del proyecto es de 207 363 636.35 US\$ y el TIR es de 76%. Ambos valores muestran que el proyecto es rentable, de manera que se puede comparar con otras alternativas con plataformas similares que tengan una capacidad de producción similar a la propuesta. Por otro lado, en cuanto al TIR analizado, se confirma la rentabilidad y garantiza un retorno del capital invertido. No obstante, esto no significa necesariamente que el proyecto vaya a ser aceptado para el caso de estudio, pues ambos índices de rentabilidad deben ser comparados con otra plataforma de producción de vacunas. En ese sentido, tomando como referencia a [7] por ser una plataforma de siguiente generación

al igual que la propuesta, el VAN con un 15% de interés al quinto año resulta ser 73 212 000 US\$ y el TIR de 46.88% para vacunas de tipo genéticas (ADN). Así pues, se puede mencionar que este proyecto [7] tiene un mayor valor actual neto al mostrado en comparación a una plataforma de ADN. Sin embargo, es importante considerar que su producción por lote es un 150% mayor en comparación a la plataforma de producción propuesta en la presente investigación.

5.10.5. Análisis de sensibilidad.

Finalmente, el análisis de sensibilidad del proceso consta de la selección y variación de parámetros económicos clave para determinar cómo es afectada la rentabilidad del proyecto en base a fluctuaciones de precio y otras variables. Se seleccionaron los criterios y rangos de variación para el estudio de sensibilidad, a partir de valores de referencia de [96] y se muestran en la **Tabla 5.46**.

Parámetro económico	Rango de variación	Justificación
CapEx	± 25%	Debido a que toma en cuenta la inversión de capital fijo y representa el 85% de la inversión inicial en el primer año.
Precio por dosis de vacuna	± 25%	El precio varía de acuerdo a la plataforma de expresión y al país donde se implemente el proceso, en ese sentido, se tomó un valor de referencia países de ingresos bajos/medios que puede variar en un rango de 20- 35% según referencias bibliográficas [25].

<p>Costo de materia prima principal (<i>nicotiana benthamiana</i>).</p>	<p>± 25%</p>	<p>Los ingresos producidos en el proceso dependen de factores como la disponibilidad de materia prima en el mercado y el nivel de investigación que se realice para mejorar la capacidad de producción.</p>
<p>Dosis por lote.</p>	<p>± 25%</p>	<p>Para verificar la tolerancia de la rentabilidad a las pérdidas en el proceso causadas por el ensuciamiento de resina en caso de los equipos cromatográficos o por la variación del nivel de expresión de la planta <i>nicotiana benthamiana</i>.</p>

Tabla 5.46. Parámetros del análisis de sensibilidad.

Así pues, al variar el parámetro económico, se calcula cuánto varía el VAN en los primeros 20 años del proyecto relativo al VAN de referencia. A continuación, se presentan los resultados del análisis de sensibilidad agrupados los 6 parámetros en tres figuras diferentes. Cabe destacar que los resultados numéricos se expresan en el Anexo 13.

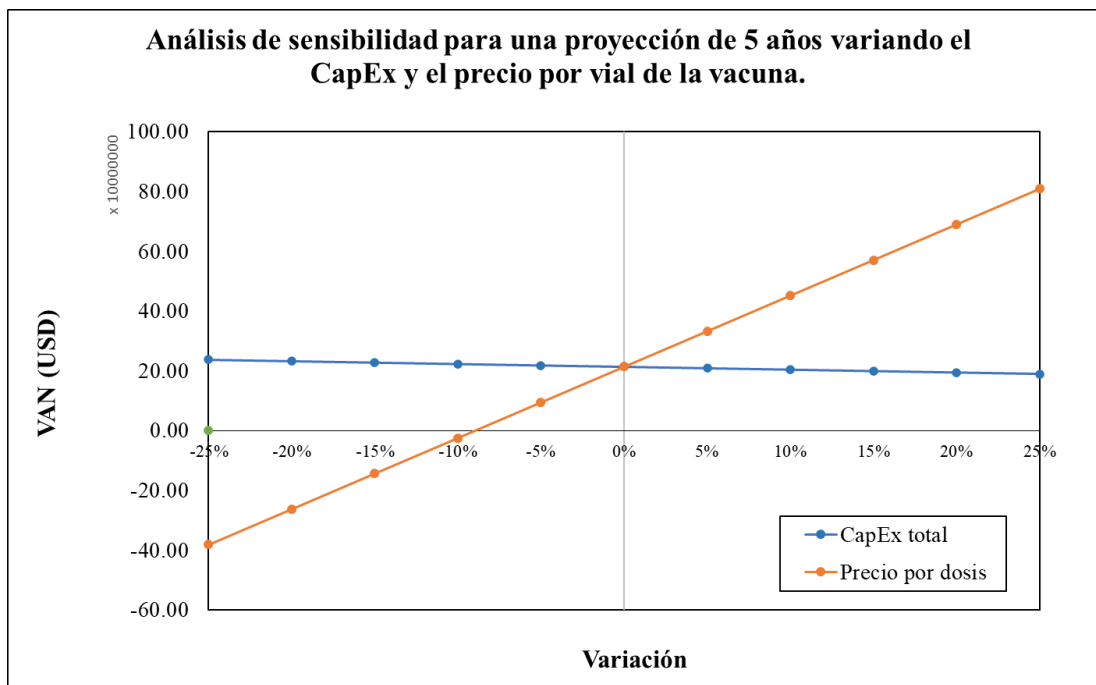


Figura 5.14. Análisis de sensibilidad para una proyección de 5 años variando el CapEx y el precio por dosis de vacuna.

En la **Figura 5.14** se aprecia que el VAN es menor conforme se usa un mayor rango de la variación para el CapEx de manera mínima, este comportamiento era de esperarse, pues al aumentar las inversiones de capital, el valor presente de los flujos de caja netos originados por una inversión va a disminuir. Si bien, la pendiente en la gráfica es menor en comparación al caso anteriormente analizado, la caída de este parámetro con una variación del 125% fue del 1.17% aproximadamente. En el caso del precio por vial (línea anaranjada), se muestra una tendencia lineal respecto al cambio en el precio de venta para las naciones de ingresos bajos/medianos, como es el caso de Perú. A medida que aumenta el precio de venta, el VAN aumenta, esto se debe al aumento del margen sobre el precio de fabricación, por lo tanto, esto aumenta las ganancias y, como resultado se tiene a un aumento del patrimonio neto de la empresa. Asimismo, de esto se puede concluir que, no se pueden fijar precios de venta por vial menores a 6.65 U\$D, pues de esta manera se obtendría un VAN de aproximadamente -54 133 815.20, lo cual hace que el proyecto no sea rentable.

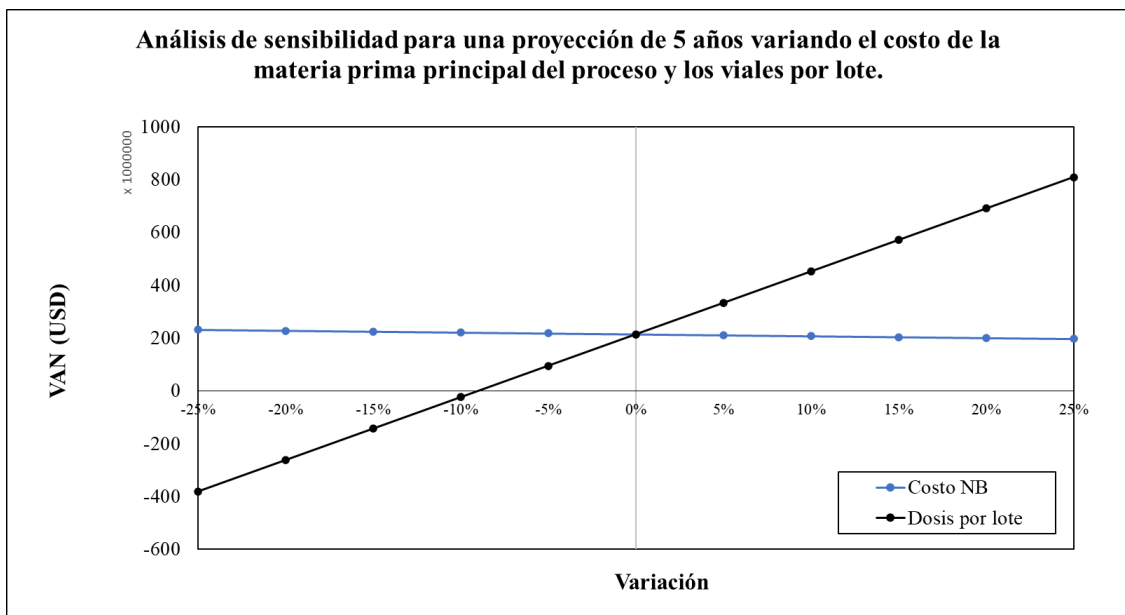


Figura 5.15. Análisis de sensibilidad para una proyección de 5 años variando el costo de la materia prima principal del proceso (hojas con VLPs) y el número de viales por lote.

La fabricación de la vacuna tiene una capacidad máxima de 17 987 879 viales por lote, que se producirán en el primer año de operación de la planta. En ese sentido, hacer un análisis de sensibilidad sobre el cambio de los volúmenes de producción permite predecir el efecto sobre el flujo de efectivo si los volúmenes iniciales aumentaran/disminuyeran si ocurren cambios repentinos en el mercado o incluso en los niveles de pérdidas en el proceso. Así pues, un competidor con un producto más efectivo puede ganar popularidad y por lo tanto forzar la reducción en los volúmenes de producción, ya que será difícil vender grandes cantidades de producto cuando un competidor tiene un punto de apoyo. Además, la vacuna tiene una vida útil de cuatro años que no debe excederse. Como se ve en la **Figura 5.15**, cuando se aumentan los volúmenes de producción, el VAN aumenta también. En ese sentido, en el caso hipotético de que esta vacuna tenga una presencia sólida y los volúmenes de producción deban aumentarse en un 20%, la instalación deberá ampliarse para dar cuenta del aumento en la producción. Finalmente, se sabe que la cantidad mínima a producir por lote debe ser el 95% del valor inicial, pues con valores menores se obtiene un VAN negativo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Por cada lote, se procesan 600 kg de biomasa en un cultivo vertical automatizado. Asimismo, se obtuvo la capacidad de producción del proceso de vacunas de VLPs mediante la recuperación de *Nicotiana benthamiana* en base al nivel de expresión del gen viral antígeno (51 mg.kg^{-1} de biomasa) y al 1.13% de los restos celulares de partícula pequeña que contiene el gen viral luego de realizarse la lisis celular (etapa de centrifugación secundaria) donde el autoensamblaje de proteínas S permite que las partículas virales formen parte del antígeno.
2. En cuanto al proceso *upstream*, se consideró que el tiempo total de cada lote desde la siembra hasta la cosecha es de 45 días, valor dependiente de factores como la edad óptima de la planta, el método de expresión transitoria y la cinética de producción de las partículas similares a virus. Por otro lado, se diseñaron las operaciones de rompimiento celular, remoción de desechos, extracción, purificación, concentración y acabado. En el caso del homogeneizador se seleccionó una temperatura óptima de 30°C y una presión de operación de 55 MPa. En el filtro de profundidad se definió que un pH entre 4.0-4.98, un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y una conductividad de $\sim 135 \text{ mS.cm}^{-1}$ mantienen la estabilidad del producto y retiran los restos celulares. Para dimensionar la centrífuga de discos se determinó el factor sigma y el máximo flujo volumétrico de discos de la marca Westfalia SC35, los cuales tomaron un valor de $26\ 000 \text{ m}^2$ y $25\ 000 \text{ L/h}$, respectivamente. Consecuentemente, se consideró el homogeneizador de alta presión Microfluidizer® M-7125, donde se determinó la constante cinética de $9.7758 \times 10^{-5} \text{ MPa}^{-2.2}$, 6 números de pasos, 850 W para la potencia del motor eléctrico y 404.61 W en cuanto a la potencia nominal requerida. En el caso de la segunda centrífuga de discos DGS/DGC 360, se definió un diámetro mínimo de $0.949 \mu\text{m}$ en relación

al flujo máximo que puede pasar por la centrífuga de $0.00026 \text{ m}^3/\text{s}$ y el factor sigma de 1146.329 m^2 . Así pues, las partículas que tengan un diámetro mayor a $0.949 \text{ }\mu\text{m}$ (partículas de interés) serán eliminadas por la centrífuga en los sedimentos, y las partículas que tengan un diámetro menor a $0.949 \text{ }\mu\text{m}$ permanecerán en el sobrenadante. En el filtro de profundidad, se seleccionó un tamaño de poro de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ para eliminar la cantidad de impurezas. A partir de ello, se determinó el área de 0.69 m^2 y el tiempo de filtración de 1.93 horas al ser una operación unitaria por lotes.

3. Finalmente, en la etapa de cromatografía, se empleó un arreglo contracorriente de columnas cromatográficas de afinidad BioSMB Process 350 y una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. En lo que respecta al arreglo cromatográfico de tres columnas en contracorriente, se decidió evaluar las curvas *breakthrough* (BTCs) a través del desarrollo de modelos matemáticos en Matlab utilizando el modelo de isotermas de adsorción de Langmuir. Se utilizó una velocidad de alimentación de 200 cm/h para los cálculos de diseño. Se determinaron los volúmenes de las soluciones *buffer* a utilizar en cada paso del arreglo cromatográfico con un valor de 103.62 L por ciclo, el tiempo de cada ciclo de 135.75 minutos y 5 ciclos necesarios para procesar la cantidad de masa que proviene del filtro de profundidad. Seguidamente, se evaluó y seleccionó un modelo de columna de intercambio aniónico en un modelo de dos pasos. Finalmente, en cuanto a la concentración y acabado, se diseñó una etapa de UF/DF usando una membrana de Candence u Omega de Pall cuyo objetivo fue disminuir las concentraciones de sales en la corriente de alimentación con un tamaño de poro con un corte de peso molecular de 30 kDa . Luego, el filtro estéril de 4.2 m^2 se diseñó con un caudal máximo de hasta 70 L/min . Finalmente, se propone un equipo de formulación Bosch FXS 5100 con ayuda de un adyuvante. Así, se determinó que, para finalizar la operación de llenado de los $17\ 987\ 879$ viales por lote (371 g de antígeno) con una tasa de llenado de $36\ 000$ viales por hora, son necesarias aproximadamente 500 horas para culminar esta última etapa del proceso aguas abajo.

4. Se realizó la evaluación de seguridad del proceso acorde a las Buenas Prácticas de Manufactura para procesos biofarmacéuticos. Para ello, se identificaron los riesgos asociados a las etapas del proceso según los grados estipulados por agencias regulatorias de productos de uso humano. Por otro lado, dado que en Perú no existen regulaciones específicas para la construcción de empresas biofarmacéuticas, se consideran las legislaciones vigentes elaboradas por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y el Ministerio de Salud (MINSA). En ese sentido, se identificaron todos los peligros y riesgos generales asociados al proceso donde la etapa más crítica fue la de la recepción de la materia prima (*nicotiana benthamiana* con VLPs) por la exposición a riesgos biológicos y contaminación con fragmentos de virus que pueden estar en el aire. Tomando como referencia la etapa con mayor riesgo, se planteó la contención en contenedores, el buen manejo efectivo del aire, el filtrado de gases de escape y el uso de equipo de protección personal como bata, mascarillas respiratorias, guantes y protectores auditivos.

5. Por último, se realizó y evaluó la viabilidad económica del proceso de producción en términos del VAN y el TIR. Para ello, fue necesario determinar el **CapEx** el cual resultó un valor de **121 091 048.07 US\$** considerando los precios de los equipos actualizados al año 2019 y el factor de localización. Asimismo, se obtuvo un **OpEx de 878 251 189.88 US\$**. El costo de producción resultó en 323 554 725.48 US\$/kg de partículas virales y el costo unitario fue de 6.84 \$/vial de vacuna. Para estos valores, se obtuvo que el **VAN en un periodo de 5 años será de 207 363 636.35 US\$ y el TIR de 76%**.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

En esta sección se presentan algunas recomendaciones a tomar en consideración para futuros trabajos acerca de la producción de vacunas de partículas virales en *Nicotiana benthamiana* en Perú con el objetivo de optimizar en términos económicos el diseño del proceso propuesto.

1. Es importante realizar una evaluación de modelos que representen la cinética de producción de proteínas objetivo como se realiza en [97], pues las propiedades y el nivel de expresión de las partículas virales en *Nicotiana benthamiana* como biorreactores puede variar significativamente al aplicar el proceso *upstream* en Perú. De esta manera, se obtendrían modelos matemáticos que representen el nivel de expresión de las partículas virales en la planta y que puedan adaptarse a diversas condiciones climáticas y a la disponibilidad de recursos.
2. Se recomienda analizar a detalle los residuos en las diferentes etapas del proceso, pues al expresar el gen viral antigénico en *Nicotiana benthamiana*, proteínas secundarias de valor comercial podrían producirse [11], lo que podría ser beneficioso para el proceso en términos económicos. No obstante, se debe evaluar también si el tratamiento (extracción y purificación) de estas justifica la inversión de capital que se tendría en cuanto a los equipos y otros costos.
3. Se recomienda hacer un plan de gestión de residuos provenientes de cada una de las corrientes de desecho en cada etapa. No obstante, se debe tener en cuenta que estos contienen material antigénico y se deben seguir todos los protocolos de bioseguridad recomendados para este tipo de procesos según las BPM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. J. Streatfield and J. A. Howard, “Plant-based vaccines,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 33, no. 5–6, pp. 479–493, 2003, doi: 10.1016/S0020-7519(03)00052-3.
- [2] K. Dhama *et al.*, “COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 16, no. 6, pp. 1232–1238, 2020, doi: 10.1080/21645515.2020.1735227.
- [3] B. Vellingiri *et al.*, “COVID-19: A promising cure for the global panic,” *Sci. Total Environ.*, vol. 725, p. 138277, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138277.
- [4] “Placebo-Controlled Trials of Covid-19 Vaccines — Why We Still Need Them,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 384, no. 2, p. e2, 2021, doi: 10.1056/nejmp2033538.
- [5] F. Krammer, “SARS-CoV-2 vaccines in development,” *Nature*, vol. 586, no. 7830, pp. 516–527, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2798-3.
- [6] R. Fischer, E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou, and R. M. Twyman, “Plant-based production of biopharmaceuticals,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 152–158, 2004, doi: 10.1016/j.pbi.2004.01.007.
- [7] S. Plotkin, J. M. Robinson, G. Cunningham, R. Iqbal, and S. Larsen, “The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview,” *Vaccine*, vol. 35, no. 33, pp. 4064–4071, 2017, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.003.
- [8] L. R.-G. and M. R. Hannah Ritchie, Esteban Ortiz-Ospina, Diana Beltekian, Edouard Mathieu, Joe Hasell, Bobbie Macdonald, Charlie Giattino, Cameron Appel, “Coronavirus (COVID-19) vaccinations,” *Our world in data: Statistics and Research*, 2021. https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL (accessed May 07, 2021).

- [9] C. Baraniuk, “How to vaccinate the world against covid-19,” *BMJ*, vol. 372, pp. 1–3, 2021, doi: 10.1136/bmj.n211.
- [10] R. Fischer and N. Emans, “Molecular farming of pharmaceutical proteins,” *Transgenic Res.*, vol. 9, no. 4–5, pp. 279–299, 2000, doi: 10.1023/a:1008975123362.
- [11] J. F. Buyel, “Plant molecular farming – Integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing,” *Front. Plant Sci.*, vol. 9, no. January, 2019, doi: 10.3389/fpls.2018.01893.
- [12] A. U. Kumar, K. Kadiresen, W. C. Gan, and A. P. K. Ling, “Current updates and research on plant-based vaccines for coronavirus disease 2019,” *Clin. Exp. Vaccine Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 13–23, 2021, doi: 10.7774/cevr.2021.10.1.13.
- [13] M. E. Horn, S. L. Woodard, and J. A. Howard, “Plant molecular farming: Systems and products,” *Plant Cell Rep.*, vol. 22, no. 10, pp. 711–720, 2004, doi: 10.1007/s00299-004-0767-1.
- [14] N. Mahmood, S. B. Nasir, and K. Hefferon, “Plant-based drugs and vaccines for COVID-19,” *Vaccines*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/vaccines9010015.
- [15] S. Nooraei *et al.*, “Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–27, 2021, doi: 10.1186/s12951-021-00806-7.
- [16] F. De Cie *et al.*, *Sustainable Food Production*. 2013.
- [17] K. Moustafa, A. Makhzoum, and J. Trémouillaux-Guiller, “Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 36, no. 5, pp. 840–850, 2016, doi: 10.3109/07388551.2015.1049934.
- [18] P. BioPharma, “What is upstream and downstream processing?,” *December 19*, 2022. <https://www.susupport.com/knowledge/single-use-technology/what-upstream-downstream-processing#:~:text=The key difference is that,filtration of the resulting product.> (accessed Jun. 03, 2023).

- [19] H. Wirz, A. F. Sauer-Budge, J. Briggs, A. Sharpe, S. Shu, and A. Sharon, “Automated production of plant-based vaccines and pharmaceuticals,” *J. Lab. Autom.*, vol. 17, no. 6, pp. 449–457, 2012, doi: 10.1177/2211068212460037.
- [20] Q. Chen and H. Lai, “Plant-derived virus-like particles as vaccines,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 9, no. 1, pp. 26–49, 2013, doi: 10.4161/hv.22218.
- [21] J. F. Buyel, R. M. Twyman, and R. Fischer, “Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 902–913, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.010.
- [22] World Health Organization (WHO), “Annex 2 WHO Good Manufacturing Practice for Biological Products,” no. 822, pp. 93–130, 2016.
- [23] O. Doblhoff-Dier and R. Bliem, “Quality control and assurance from the development to the production of biopharmaceuticals,” *Trends Biotechnol.*, vol. 17, no. 7, pp. 266–270, 1999, doi: 10.1016/S0167-7799(99)01314-1.
- [24] Z. Kis, C. Kontoravdi, A. K. Dey, R. Shattock, and N. Shah, “Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response,” *J. Adv. Manuf. Process.*, vol. 2, no. 3, p. e10060, 2020, doi: 10.1002/amp2.10060.
- [25] Y. Shoji *et al.*, “A plant-based system for rapid production of influenza vaccine antigens,” *Influenza Other Respi. Viruses*, vol. 6, no. 3, pp. 204–210, 2012, doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00295.x.
- [26] P. N. Desai, N. Shrivastava, and H. Padh, “Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 4, pp. 427–435, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.005.
- [27] N. Charland, “Plant-Made Influenza Virus-Like Particles : for Pandemic and Beyond Plant-Made Influenza Virus-Like Particles : for Pandemic and Beyond Nathalie Charland , PhD Director , Product Portfolio,” 2013.
- [28] E. P. Rybicki, “Plant-based vaccines against viruses,” *Virol. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–

20, 2014, doi: 10.1186/s12985-014-0205-0.

- [29] C. Potera, “Vaccine manufacturing gets boost from tobacco plants: Canada-based medicago opens U.S. Facility to exploit its influenza vaccine production method,” *Genet. Eng. Biotechnol. News*, vol. 32, no. 6, pp. 8–10, 2012, doi: 10.1089/gen.32.6.02.
- [30] Y. Shoji *et al.*, “A plant-produced H1N1 trimeric hemagglutinin protects mice from a lethal influenza virus challenge,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 9, no. 3, pp. 553–560, 2013, doi: 10.4161/hv.23234.
- [31] M. Tan and X. Jiang, “Vaccine against norovirus,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 10, no. 6, pp. 1449–1456, 2014, doi: 10.4161/hv.28626.
- [32] Y. Thanavala *et al.*, “Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 9, pp. 3378–3382, 2005, doi: 10.1073/pnas.0409899102.
- [33] L. M. Branco *et al.*, “Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever,” *Viol. J.*, vol. 7, no. 1, p. 279, 2010, doi: 10.1186/1743-422X-7-279.
- [34] FDA, “FDA approves new orphan drug to treat a form of Gaucher disease.” https://www.gaucher.org.uk/news/fda_approves_new_orphan_drug_to_treat_a_form_of_gaucher_disease (accessed Jul. 23, 2021).
- [35] S. Rosales-Mendoza, V. A. Márquez-Escobar, O. González-Ortega, R. Nieto-Gómez, and J. I. Arévalo-Villalobos, “What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19?,” *Vaccines*, vol. 8, no. 2, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3390/vaccines8020183.
- [36] A. Wang and S. Ma, *Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects*, vol. 9789400722. 2012.
- [37] E. Rybicki, “History and promise of plant-made vaccines for animals,” *Prospect*.

Plant-Based Vaccines Vet. Med., pp. 1–22, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-90137-4_1.

- [38] K. Dhama *et al.*, “Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 16, no. 12, pp. 2913–2920, 2020, doi: 10.1080/21645515.2020.1842034.
- [39] L. R. Wilken and Z. L. Nikolov, “Recovery and purification of plant-made recombinant proteins,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 2, pp. 419–433, 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020.
- [40] D. Tusé, T. Tu, and K. A. McDonald, “Manufacturing economics of plant-made biologics: Case studies in therapeutic and industrial enzymes,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/256135.
- [41] E. Łojewska, T. Kowalczyk, S. Olejniczak, and T. Sakowicz, “Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 120, pp. 110–117, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2015.12.018.
- [42] B. Manser, M. Glenz, and M. Bisschops, “Single-Use Downstream Processing for Biopharmaceuticals,” *Single-Use Technol. Biopharm. Manuf.*, pp. 117–126, 2019, doi: 10.1002/9781119477891.ch9.
- [43] F. Shojaei Jeshvaghani *et al.*, “Oral immunization with a plant-derived chimeric protein in mice: Toward the development of a multipotent edible vaccine against *E. coli* O157: H7 and ETEC,” *Immunobiology*, vol. 224, no. 2, pp. 262–269, 2019, doi: 10.1016/j.imbio.2018.12.001.
- [44] J. F. Buyel, R. M. Twyman, and R. Fischer, “Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 35, no. 4, pp. 458–465, 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.011.
- [45] E. Mahajan, A. George, and B. Wolk, “Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1227, pp. 154–162, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.12.106.

- [46] J. Zischewski, M. Sack, and R. Fischer, “Overcoming low yields of plant-made antibodies by a protein engineering approach,” *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 107–116, 2016, doi: 10.1002/biot.201500255.
- [47] D. van Riel and E. de Wit, “Next-generation vaccine platforms for COVID-19,” *Nat. Mater.*, vol. 19, no. 8, pp. 810–812, 2020, doi: 10.1038/s41563-020-0746-0.
- [48] Fabiola León-Valverde (CONCYTEC), “COVID-19: La carrera peruana por la vacuna,” *Vaccine news*, 2020. <https://portal.concytec.gob.pe/index.php/noticias/2338-covid-19-la-carrera-peruana-por-la-vacuna> (accessed Oct. 12, 2020).
- [49] J. Fuenmayor, F. Gòdia, and L. Cervera, “Production of virus-like particles for vaccines,” *N. Biotechnol.*, vol. 39, no. 16, pp. 174–180, 2017, doi: 10.1016/j.nbt.2017.07.010.
- [50] Medicago, “Developing novel vaccines and therapeutic proteins,” [Internet], 2020. <https://www.medicago.com/en/> (accessed May 30, 2021).
- [51] J. O. Josefsberg and B. Buckland, “Vaccine process technology,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 6, pp. 1443–1460, 2012, doi: 10.1002/bit.24493.
- [52] S. Menzel, T. Holland, A. Boes, H. Spiegel, R. Fischer, and J. F. Buyel, “Downstream processing of a plant-derived malaria transmission-blocking vaccine candidate,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 152, no. March, pp. 122–130, 2018, doi: 10.1016/j.pep.2018.07.012.
- [53] J. F. Buyel and R. Fischer, “Scale-down models to optimize a filter train for the downstream purification of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco leaves,” *Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 3, pp. 415–425, 2014, doi: 10.1002/biot.201300369.
- [54] N. K. Tripathi and A. Shrivastava, *Scale up of biopharmaceuticals production*. Elsevier Inc., 2017.
- [55] H. Peyret, “A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants,” *J. Virol. Methods*, vol. 225, pp. 59–63, 2015, doi:

10.1016/j.jviromet.2015.09.005.

- [56] S. Leweke and E. von Lieres, “Chromatography Analysis and Design Toolkit (CADET),” *Comput. Chem. Eng.*, vol. 113, pp. 274–294, 2018, doi: 10.1016/j.compchemeng.2018.02.025.
- [57] S. L. Mistry, A. Kaul, J. C. Merchuk, and J. A. Asenjo, “Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction,” *J. Chromatogr. A*, vol. 741, no. 2, pp. 151–163, 1996, doi: 10.1016/0021-9673(96)00179-3.
- [58] L. K. Shekhawat, J. Sarkar, R. Gupta, S. Hadpe, and A. S. Rathore, “Application of CFD in Bioprocessing: Separation of mammalian cells using disc stack centrifuge during production of biotherapeutics,” *J. Biotechnol.*, vol. 267, no. October 2017, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.12.016.
- [59] and D. P. P. R. G. Harrison, P. Todd, S. R. Rudge, *Bioseparations science and engineering*, Second. Oxford University Press, 2015.
- [60] F. Carlsson, A. Axelsson, and G. Zacchi, “Mathematical modelling and parametric studies of affinity chromatography,” *Comput. Chem. Eng.*, vol. 18, pp. S657–S661, 1994, doi: 10.1016/0098-1354(94)80107-X.
- [61] ISO 14026, “International Standard International Standard,” *61010-1 © Iec2001*, vol. 2014, p. 13, 2014.
- [62] G. D. E. La, S. D. E. Procesos, and B. En, “Guidelines for Risk Based Process Safety,” *Guidel. Risk Based Process Saf.*, 2010, doi: 10.1002/9780470925119.
- [63] *Guidelines for Process Safety in Bioprocess Manufacturing Facilities*. 2010.
- [64] V. Casson Moreno, E. Giacomini, and V. Cozzani, “Identification of major accident hazards in industrial biological processes,” *Chem. Eng. Trans.*, vol. 48, pp. 679–684, 2016, doi: 10.3303/CET1648114.

- [65] K. D. T. y R. E. W. M. S. Peters, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. New York: McGraw Hill, 2003.
- [66] Food and Drug Administration, “Guidance for Industry General Principles for the Development of Vaccines,” *FDA Guid. Ind.*, no. December, 2011.
- [67] D. Reader, J. Li, A. McDonnell, and P. Yadav, “Modelling the Manufacturing Process for COVID-19 Vaccines : Our Approach,” 2020.
- [68] S. R. Weiss and J. L. Leibowitz, *Coronavirus pathogenesis*, 1st ed., vol. 81. Elsevier Inc., 2011.
- [69] L. G. Braga, T. E. Da Silva, F. O. Cintra, and M. Takagi, “Mathematical model for simultaneous microfiltration and ultrafiltration of Haemophilus influenzae type b to cell separation and polysaccharide recovery,” *J. Memb. Sci.*, vol. 481, pp. 188–194, 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2015.01.049.
- [70] O. Coskun, “Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY,” *North. Clin. Istanbul*, vol. 3, no. 2, pp. 156–160, 2016, doi: 10.14744/nci.2016.32757.
- [71] A. Ljunglöf *et al.*, “Ion exchange chromatography of antibody fragments,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 96, no. 3, pp. 515–524, 2007, doi: 10.1002/bit.21124.
- [72] M. Salte, Heidi; King, Josh; Baganz, Frank; Hoare, “A Methodology for Centrifuge Selection for the Separation of High Solids Density Cell Broths by Visualisation of Performance Using Windows of Operation,” *Willey*, 2006, doi: 10.1002/bit.21102.
- [73] L. Fernandez-Cerezo, A. C. M. E. Rayat, A. Chatel, J. M. Pollard, G. J. Lye, and M. Hoare, “An ultra scale-down method to investigate monoclonal antibody processing during tangential flow filtration using ultrafiltration membranes,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 116, no. 3, pp. 581–590, 2019, doi: 10.1002/bit.26859.
- [74] D. Baur, M. Angarita, T. Müller-Späth, F. Steinebach, and M. Morbidelli, “Comparison of batch and continuous multi-column protein A capture processes by optimal design,” *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 7, pp. 920–931, 2016, doi:

10.1002/biot.201500481.

- [75] M. Benenaula and W. Sanmartin, *Diseño y construcción de un homogeneizador por inmersión de alto cizallamiento, para la empresa Formalab*. 2016.
- [76] UltraCleanplace, “M-7125 , M-7250 Basic BioPharmaceutical Microfluidizer ® Processor,” pp. 10–11, [Online]. Available: <https://www.microfluidicscorp.com/sites/default/files/BP700Basic.pdf>.
- [77] H. El-Sabbahy, D. Ward, O. Ogonah, L. Deakin, G. M. Jellum, and D. G. Bracewell, “The effect of feed quality due to clarification strategy on the design and performance of protein A periodic counter-current chromatography,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 34, no. 6, pp. 1380–1392, 2018, doi: 10.1002/btpr.2709.
- [78] 3M, “3M™ Zeta Plus™ SA Series Filter Cartridge,” 2019. https://www.3m.com.es/3M/es_ES/p/d/b40070858/.
- [79] Z. L. Nikolov and S. L. Woodard, “Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, no. 5, pp. 479–486, 2004, doi: 10.1016/j.copbio.2004.08.006.
- [80] D. M. F. Prazeres and G. N. M. Ferreira, “Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination,” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 43, no. 5, pp. 609–624, 2004, doi: 10.1016/j.cep.2003.02.002.
- [81] A. Gabelman, “Adsorption basics: Part 2,” *Chem. Eng. Prog.*, vol. 113, no. 8, pp. 1–6, 2017.
- [82] C. Shi *et al.*, “Process development and optimization of continuous capture with three-column periodic counter-current chromatography,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 118, no. 9, pp. 3313–3322, 2021, doi: 10.1002/bit.27689.
- [83] Sartorius, “Chromatography Systems,” 2020. <https://www.sartorius.com/en/products/process-chromatography/chromatography-systems/continuous-chromatography>.

- [84] L. Mousavizadeh and S. Ghasemi, “Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis,” *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, no. xxxx, pp. 0–4, 2020, doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.
- [85] J. E. Ladwig, X. X. Zhu, P. Rolandi, R. Hart, J. Robinson, and A. Rydholm, “Mechanistic model of pH and excipient concentration during ultrafiltration and diafiltration processes of therapeutic antibodies,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 36, no. 5, pp. 1–19, 2020, doi: 10.1002/btpr.2993.
- [86] J. M. Pinto, J. M. Montagna, A. R. Vecchiotti, O. A. Iribarren, and J. A. Asenjo, “Process performance models in the optimization of multiproduct protein production plants,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 74, no. 6, pp. 451–465, 2001, doi: 10.1002/bit.1136.
- [87] Merck Millipore, “Generic process of cell culture based influenza vaccine,” pp. 1–8, 2014.
- [88] Fisher, “Válvula de globo D4,” 2019. <https://www.directindustry.es/prod/fisher-regulators/product-14723-1876138.html>.
- [89] S. Zobel, C. Helling, R. Ditz, and J. Strube, “Design and operation of continuous countercurrent chromatography in biotechnological production,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, no. 22, pp. 9169–9185, 2014, doi: 10.1021/ie403103c.
- [90] Flussotech, “Intercambiador de calor de placas planas.” <https://flussotech.com.pe/landing.php?producto=116>.
- [91] C. S. Plüsch, B. Bössenecker, L. Dobler, and A. Wittemann, “Zonal rotor centrifugation revisited: New horizons in sorting nanoparticles,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 47, pp. 27549–27559, 2019, doi: 10.1039/c9ra05140f.
- [92] B. Services, “BioSolve Data Base.” <https://www.biopharmservices.com/biosolve-software/biosolve-process/> (accessed Nov. 20, 2021).
- [93] “Sartoclear Depth Filter,” 2020. [sartorius.com/en/products/process-filtration/cell-harvesting/sartoclear-depthfilters](https://www.sartorius.com/en/products/process-filtration/cell-harvesting/sartoclear-depthfilters).

- [94] J. Anderson, "Determining manufacturing costs," *Chem. Eng. Prog.*, vol. 105, no. 1, pp. 27–31, 2009.
- [95] N. C. Kyriakidis, A. López-Cortés, E. V. González, A. B. Grimaldos, and E. O. Prado, "SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates," *npj Vaccines*, vol. 6, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41541-021-00292-w.
- [96] G. Towler and R. Sinnott, *Chemical Engineering Design*, 2nd ed. Elsevier Ltd, 2013.
- [97] J. F. Buyel and R. Fischer, "Predictive models for transient protein expression in tobacco (*nicotiana tabacum* l.) can optimize process time, yield, and downstream costs," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 10, pp. 2575–2588, 2012, doi: 10.1002/bit.24523.
- [98] M. M. Levine and M. B. Sztein, "Vaccine development strategies for improving immunization: The role of modern immunology," *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 5, pp. 460–464, 2004, doi: 10.1038/ni0504-460.
- [99] C. D. Funk, C. Laferrière, and A. Ardakani, "A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic," vol. 11, no. June, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00937.
- [100] S. Rauch, E. Jasny, K. E. Schmidt, and B. Petsch, "New vaccine technologies to combat outbreak situations," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. SEP, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01963.
- [101] A. Ghorbani, F. Zare, S. Sazegari, A. Afsharifar, M. H. Eskandari, and A. Pormohammad, "Development of a novel platform of virus-like particle (VLP)-based vaccine against COVID-19 by exposing epitopes: an immunoinformatics approach," *New Microbes New Infect.*, vol. 38, p. 100786, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100786.

ANEXOS

Anexo 1: Glosario de términos.

1. **Anticuerpos monoclonales**, es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B.
2. **Antígeno**, sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.
3. **Autoensamblaje molecular**, proceso en el que las moléculas se asocian de manera espontánea creando estructuras por interacciones no covalentes (sin compartir electrones). Permite acceder a moléculas funcionales a partir de bloques orgánicos sencillos.
4. **Capsómeros**, son las subunidades morfológicas de la cápside, ya sea icosaédrica o helicoidal, una cubierta exterior de la proteína o poliproteína que protege el material genético de un virus.
5. **Cuerpos de inclusión**, agregados de tipos específicos de proteínas que se encuentran en las neuronas, una serie de células de tejido que incluyen glóbulos rojos, bacterias, virus y plantas.
6. **Curvas breakthrough**. es el comportamiento que tiene la concentración en la adsorción del efluente a la salida, y su importancia radica en la caracterización de materiales porosos.
7. **Epítipo**, es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos, los receptores de las células B o los receptores de las células T.
8. **Microorganismos adventicios**, contaminantes de cultivos celulares o materias primas que puedan ser introducidos durante el proceso de fabricación de un producto biológico.
9. **Proteína diana**, cumple funciones de interacción con otras moléculas, de manera que cada una de estas moléculas interactúan con su diana produciendo cambios o expresiones de la misma.

10. **Proteínas recombinantes**, obtenidas a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original.
11. **Velocidad intersticial**, es la velocidad de movimiento de la solución dentro de los poros, así como de un poro a otros en medios porosos con contenido de humedad.

Anexo 2: Tipos de diseño de investigación asociados a los objetivos específicos planteados.

<p>Objetivo general: Diseñar un proceso para la recuperación de vacunas de partículas virales contra la COVID-19 a base de <i>nicotiana benthamiana</i> enfocado en las etapas <i>downstream</i> de extracción, separación y purificación.</p>		
Objetivo específico	Estudio	Tipo de diseño de investigación
Determinar la capacidad de producción del proceso a partir de información bibliográfica de plataformas convencionales de producción de vacunas de VLPs derivadas de células vegetales.	Descriptivo	Transeccional descriptivo
Estableces los parámetros operacionales del proceso de producción aguas arriba ^b de las vacunas de VLPs	Descriptivo	Transeccional descriptivo
Dimensionar y seleccionar los equipos de las operaciones de extracción, clarificación, purificación, concentración y acabado en base a los balances de materia y energía y a la capacidad de diseño seleccionada.	Descriptivo	Transeccional descriptivo
Evaluar la seguridad del proceso en base a las buenas prácticas de manufactura de procesos y la viabilidad económica en términos del VAN y el TIR	No está asociado a un diseño de experimentación, se realizarán cálculos en base a parámetros ya definidos	

Tabla A2.1. Objetivos específicos y diseños de investigación asociados

Anexo 3: Avances en el desarrollo de vacunas de virus como partículas a base de plantas contra la COVID-19.

Una vacuna permite la generación de anticuerpos contra un virus o bacteria, pero sin causar la infección proporcionando inmunidad contra el patógeno. En tal sentido, el estudio y desarrollo de vacunas, como productos que producen inmunidad a la COVID-19, concentra la atención de la comunidad científica que está desarrollando múltiples estrategias para promover la protección positiva frente a la COVID-19.

En el camino para encontrar la “vacuna ideal”, los científicos deben seguir los procedimientos padrones para tener una vacuna aprobada para la humanidad. Según [98], el primer paso es realizar investigación y desarrollo en laboratorio, lo cual implica la selección de plataformas, diseño de objetivos y pruebas preclínicas (uso de células *in-vitro* en cultivos y pruebas *in-vivo* en animales). Si los resultados en esta fase son confiables, la vacuna candidata se lleva a la fase clínica, que consiste en probar las vacunas en humanos en tres etapas principales y sucesivas, que se pueden ver en la Fig 3.2. Sin embargo, debido a la naturaleza pandémica de COVID-19, algunas fases secuenciales se están llevando a cabo simultáneamente bajo aprobaciones aceleradas para autorizaciones de uso de emergencia.

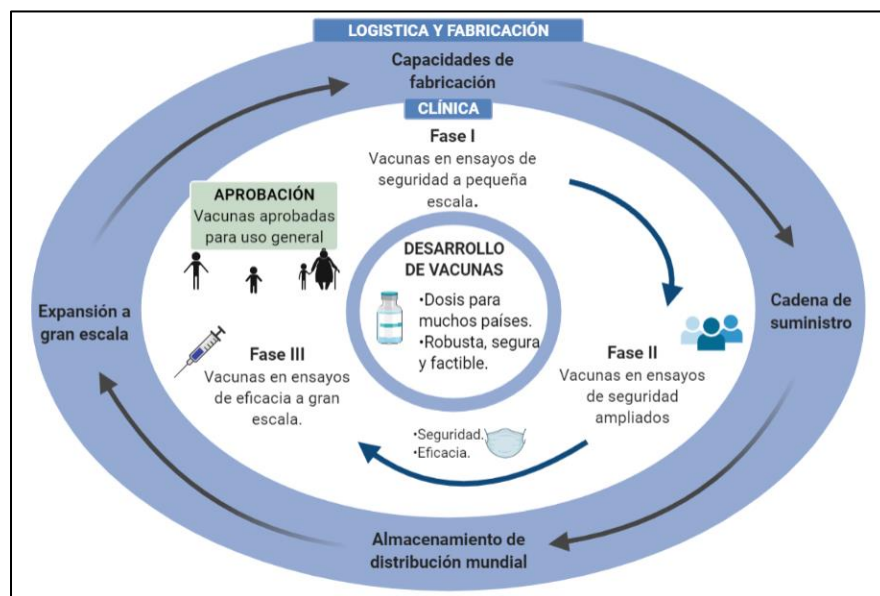


Figura A3.1. Ruta para la vacuna COVID-19 en términos de logística, fabricación y desarrollo representada por círculos concéntricos. Elaboración propia basada en [99].

Finalmente, es necesario mencionar que para que una vacuna sea aprobada esta debe generar una respuesta inmune robusta que produzca anticuerpos neutralizantes de larga duración contra los antígenos de la COVID-19 cumpliendo con los reglamentos de cGMP [100].

El tema de la presente tesis se enfoca en las vacunas VLP a base de plantas, por lo que se realiza una revisión de la literatura con el propósito de conocer las vacunas candidatas a vacunas que utilizan esta tecnología más a detalle, cuyos estudios se encuentran aún en las diferentes etapas clínicas hasta la última semana del mes de mayo del 2021.

En julio del 2020, la empresa biofarmacéutica Medicago (Quebec, Canadá) empezó sus estudios clínicos en fase 1 para producir una vacuna viable y eficaz para combatir la infección por COVID-19 [50]. Medicago ha empleado plantas como biorreactores para la producción de una vacuna debido a la capacidad de complementar las cepas diana con precisión, la rapidez del proceso, la capacidad de escalar y su versatilidad para la producción de anticuerpos utilizando la tecnología basada en plantas. Específicamente, la biofarmacéutica está empleando VLP que se cultivan en *nicotiana benthamiana*, una especie de planta de la familia del tabaco que ha sido utilizada ampliamente en la producción biofarmacéutica debido a su capacidad para expresar secuencias de genes [14]. Por otro lado, Medicago se ha asociado con GlaxoSmithKline (GSK) mediante el uso de la tecnología adyuvante de vacunas de GSK con el fin de estimular las respuestas inmunitarias, lo que permite administrar dosis más bajas de vacuna [101]. Posteriormente, se informó que se obtuvieron resultados prometedores de los ensayos clínicos de fase 1 después de dos dosis de la vacuna candidata con adyuvante en un período corto de tiempo con efectos secundarios relativamente leves. Y, un ensayo de fase 2 también proporcionó resultados alentadores. Así pues, el 16 de marzo de 2021, se iniciaron los estudios en fase 3, los cuales todavía se encuentran en desarrollo. Finalmente, en abril del 2021 el gobierno canadiense anunció una revisión continua de la vacuna de la empresa y un representante del equipo

investigador anunció en una conferencia en mayo que la compañía espera obtener la autorización para su vacuna en Canadá en el tercer trimestre de 2021 [14].

Posteriormente, la segunda biofarmacéutica en anunciar el inicio de pruebas clínicas de una vacuna a base de plantas fue Kentucky BioProcessing, una subsidiaria estadounidense de British American Tobacco. En los esfuerzos por desarrollar una posible vacuna COVID-19, similar a Medicago, esta compañía utiliza *N. benthamiana* como biorreactor para la producción de la proteína recombinante [14]. La biofarmacéutica no ha brindado más información acerca de los resultados de fase 1 de la candidata a vacuna; no obstante, es necesario mencionar que aparte del desarrollo actual de la vacuna COVID-19, KBP ha desarrollado con éxito un fármaco para el tratamiento del ébola utilizando la misma tecnología [100].

Anexo 4: Ventajas y desventajas de diversas tecnologías utilizadas en la extracción, clarificación y purificación de vacunas a base de plantas.

Etapa del proceso	Operación	Ventajas	Desventajas	Otros comentarios
Extracción	Homogeneizador a base de cuchillas.	Aplicable a todo tipo de proteínas.	Discontinuo. Escalabilidad limitada debido a la relación volumen/área y la entrada de energía.	El funcionamiento alterno de varios dispositivos puede facilitar el procesamiento semicontinuo.
	Centrifugación por infiltración.	Extracción reducida de proteínas. Carga de partículas reducida.	Discontinuo. Escalabilidad limitada debido a los requisitos de fuerza establecidos. Limitado a proteínas secretadas. Técnicamente exigente.	
	Rizosecreción continua.	Extracción de proteínas reducida. Carga de partículas reducida.	Grandes volúmenes de proceso. Limitado a proteínas secretadas.	Se requiere cultivo hidropónico.
	Prensa de tornillo.	Aplicable a todo tipo de proteínas. Continuo. Carga de proteínas reducida.	Puede interferir con las proteínas objetivo. Sensible a pH bajo.	Extracción en ausencia de solución <i>buffer</i> .

Clarificación	Centrifugación	Bajos costes de consumibles.	Discontinuo. Alta demanda de energía. Escalabilidad limitada.	
	Filtración	Continuo. Escalabilidad lineal. Reducción de ADN e impurezas.	Altos costes de consumibles.	
	Filtros auxiliares	Mayor capacidad de filtrado.	Mayor inversión y costos de consumibles.	
	Auxiliares de floculación/filtración	Mayor capacidad de filtrado.	Mayor inversión y costos de consumibles. Puede interferir con los pasos posteriores del proceso.	Pueden ser necesarios ensayos especiales que confirmen la ausencia de floculantes en el producto final.
	UF/DF	Reducción del volumen del proceso.	Mayor inversión y costos de consumibles.	Operación continua. Mayor pureza para determinadas proteínas.
Purificación	Adsorbentes de membrana.	Altos caudales.	Discontinuos. Baja capacidad.	El suministro puede ser difícil.
	Cromatografía de lecho compacto.	Alta capacidad de unión.	Discontinua. Caudales bajos.	
	Cromatografía de intercambio iónico.	Costos de inversión y consumibles reducidos.	Se requiere un sistema de control sofisticado.	Aplicable a adsorbentes y columnas de lecho empacado

Tabla A4.1. Ventajas y desventajas de las operaciones de procesamiento aguas debajo de proteínas.

Elaboración propia, adaptado de [44].

Anexo 5: Porcentajes de deducción típicos utilizados para el cálculo de la inversión de capital fijo (FCI).

Tipos de costos	Costos asociados	Porcentaje promedio	Rango de porcentajes
Costos directos totales (TPDC)	Instalación	0.5 x PC ^a	0.2-1.5
	Tuberías	0.4 x PC ^a	0.3-0.6
	Instrumentación	0.35 x PC ^a	0.2-0.6
	Aislamiento	0.03 x PC ^a	0.01-0.05
	Conexiones eléctricas	0.15 x PC ^a	0.1-0.2
	Instalaciones	0.45 x PC ^a	0.1-3.0
	Mejora del terreno	0.15 x PC ^a	0.05-0.2
	Instalaciones auxiliares	0.5 x PC ^a	0.2-1.0
Costos indirectos totales (TPIC)	Ingeniería	0.25 x TPDC	0.2-0.3
	Construcción	0.35 x TPDC	0.3-0.4
Costos totales de la planta (TPC)	-	(TPDC + TPIC)	-
Costos de capital fijo (DFC)	Costos totales de la planta (TPC)	(TPC)	-
	Impuestos de la contratista	0.05 x PC	0.03-0.08
	Contingencia	0.1 x TPC	0.07-0.15

Tabla A5.1. Porcentajes de deducción típicos utilizados para el cálculo de la inversión de capital fijo (FCI).

a. PC es el costo de compra de los equipos [59].

Anexo 6: Consideraciones y parámetros para la determinación del OPEX.

Para la determinación de los costos fijos se emplean las consideraciones preestablecidas por [59]

- Los costos de mantenimiento se asumirán como el 10% del precio de compra de los equipos del proceso (PC).
- El costo de los servicios de aseguramiento e impuestos locales del proyecto se determinarán como el 1 y 2% de la inversión de capital fijo (FCI), respectivamente.
- Se considerará un costo base de mano de obra de \$6/h y los costos de beneficios, supervisión, suministros y administrativos se aproximaron como el 40, 20, 10 y 60% del costo de mano de obra.
- Los costos de los laboratorios, control de calidad y aseguramiento de calidad se determinarán como el 15% del costo total de mano de obra.
- La depreciación se calculó utilizando el método de depreciación MACRS para un período de recuperación de 5 años.

Asimismo, los porcentajes de valores típicos asociados a los costos operativos directos e indirectos.

Ítem	Tipo de costo	Valores porcentuales
Materias primas	Directo	10-80%
Labor	Directo	10-50%
Bienes de consumo	Directo	1-50%
Control de calidad	Directo	1-50%
Tratamiento de efluentes	Directo	1-20%
Utilidades	Directo	1-30%
Gastos propios en instalaciones	Indirecto	10-70%

Tabla A6.1. Porcentajes asociados a los costos indirectos y directos de un proceso [59]

Anexo 7: Diagrama de bloques del proceso.

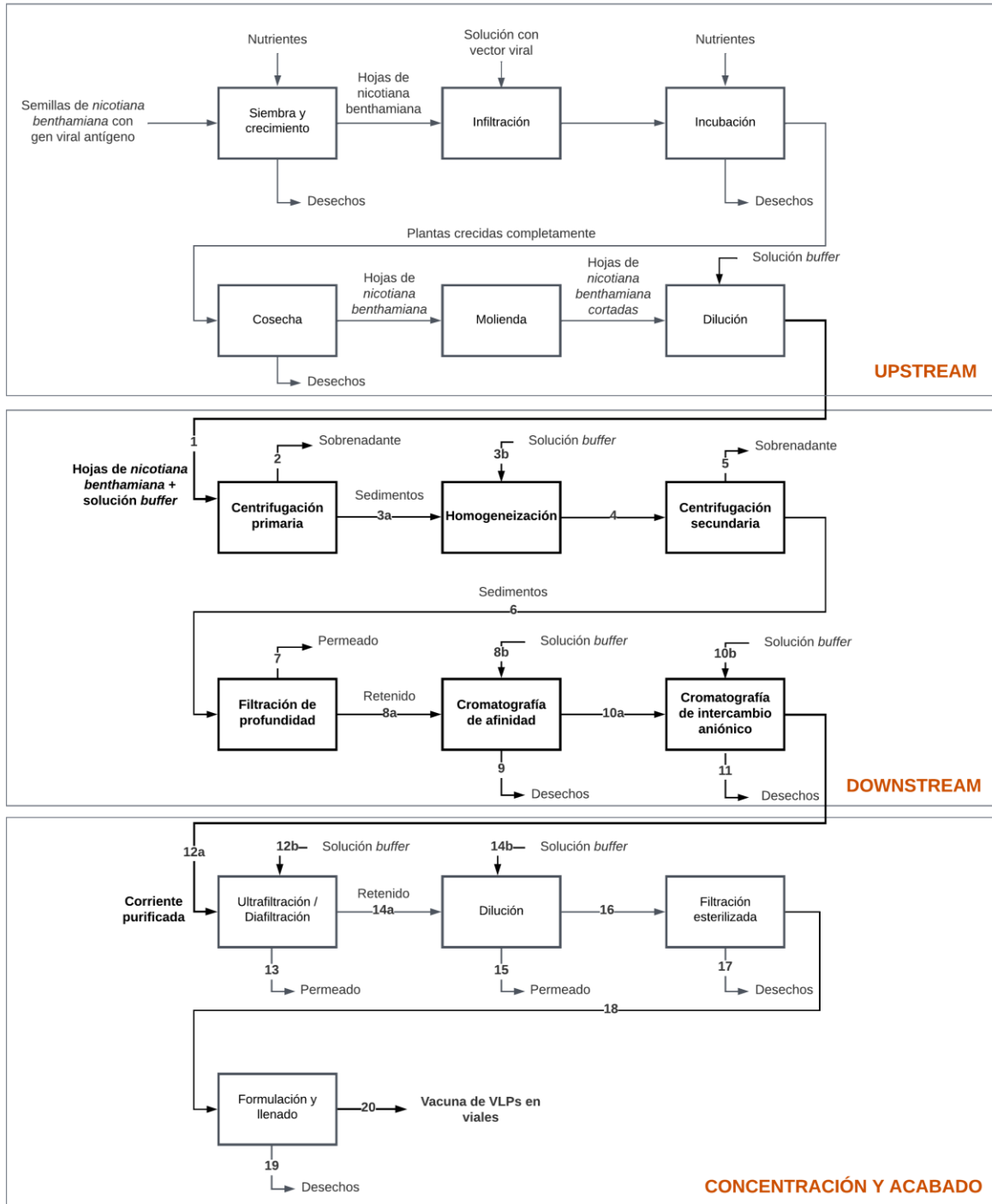


Figura A7.1. Diagrama de bloques del proceso

Anexo 8: Tabla de balances de materia de todas las corrientes del proceso.

		1	2	3a	3b	4	4a	5	6	7	8a	8b	9	10a	10b	11	12a	12b	13	14a	14a	15	16	17	18	19	20		
Sólidos	Biomasa entera	570.00	28.50	541.50	0.00	10.83	10.29	0.51	9.31	8.37	0.93	0.00	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	VLPs	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.00	0.47	0.00	0.01	0.46	0.00	0.01	0.45	0.00	0.04	0.42	0.00	0.01	0.41	0.02	0.39	0.02	0.37		
	Desechos partícula grande	15.00	1.50	13.50	0.00	40.03	40.30	4.03	36.27	36.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Desechos partícula pequeña	0.00	0.00	0.00	0.00	238.80	238.80	238.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Contaminantes solubles	HCP	8.25	7.12	1.13	0.00	147.81	147.96	145.09	2.87	1.43	1.43	0.00	1.42	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	
	Otros	6.75	5.83	0.92	0.00	119.58	119.70	119.67	0.03	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Total	15.00	12.95	2.05	0.00	267.39	267.66	264.76	2.90	1.46	1.44	0.00	1.43	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	
Solución buffer A		2454.55	2117.88	336.67	0.00	336.67	336.67	333.02	3.65	0.37	3.29	0.00																	
Solución buffer B		0.00	0.00	0.00	2200.00	2200.00	2200.00	2176.18	23.82	2.38	21.44	0.00	24.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Solución buffer C+D+E+F+G cromatografía afinidad		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	103.62	98.45	5.18	0.00	4.92	0.26	0.00	0.01	0.25	0.00	0.23	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	
Solución buffer C+D+E+F+G+H cromatografía AEX		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	814.00	773.30	40.70	0.00	2.03	38.67	0.00	36.73	1.93	0.10	1.84	0.09	1.74			
Solución buffer I+J UE/DF		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	356.50	17.82	338.68	0.00	321.74	16.93	0.85	16.09	0.80	15.28			
Solución buffer J dilución		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2407.22	120.36	2286.86	114.34	2172.52	108.63	2063.89			
Masa total		3054.55	2160.83	893.72	2200.00	3093.72	3093.72	3017.31	76.42	48.85	27.57	103.62	125.54	5.65	814.00	778.23	41.42	356.50	19.90	378.02	2407.22	479.08	2306.16	115.31	2190.85	109.55	2081.30		
	Buffer A (8M urea, 50 mM NaCl, 20 mM Bis-tris propane, pH 7.0)	2454.55	2117.88	336.67	0.00	336.67	336.67	333.02	3.65	0.37	3.29	0.00	3.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Buffer B (NaCl 50 mM+ TRIS 10 mM, pH 8)	0.00	0.00	0.00	2200.00	2200.00	2200.00	2176.18	23.82	2.38	21.44	0.00	21.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Buffer C (Dihidrofato de sodio 50 mM + NaCl 1 M)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.25	11.64	0.61	0.00	0.58	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Buffer D (Dihidrofato de sodio 28 mM + Na2HPO4 14 mM + NaCl 95 mM)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	41.74	39.65	2.09	264.00	252.79	13.30	0.00	0.67	12.64	0.00	12.01	0.63	0.03	0.60	0.03	0.57		
	Buffer E (Citrato de sodio 100 mM + NaCl 500 mM + HCl 12 mM) + (Citrato de sodio 54 mM + HCl 2 mM)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.51	15.68	0.83	264.00	251.59	13.24	0.00	0.66	12.58	0.00	11.95	0.63	0.03	0.60	0.03	0.57		
	Buffer F (Citrato de sodio 5 mM + Ácido acético 100 mM)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.87	19.83	1.04	110.00	105.49	5.55	0.00	0.28	5.27	0.00	5.01	0.26	0.01	0.25	0.01	0.24		
	Buffer G (NaOH 100 mM + NaCl 500 mM)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.25	11.64	0.61	0.00	0.58	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Buffer H (Na Cl 2M + NaOH 2M)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	176.00	167.20	8.80	0.00	0.44	8.36	0.00	7.94	0.42	0.02	0.40	0.02	0.38		
	Buffer I (Na Cl 2M + NaOH 2M)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	164.00	162.36	1.64	0.00	1.56	0.08	0.00	0.08	0.00	0.07		
	Buffer J (Agua)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	192.50	96.25	96.25	2400.00	211.44	2284.81	114.24	2170.57	108.53	2062.04		
Total		2454.55	2117.88	336.67	2200.00	2536.67	2536.67	2509.20	27.47	2.75	24.72	103.62	123.17	5.18	814.00	778.22	40.96	356.50	260.66	136.80	2400.00	249.96	2286.84	114.34	2172.50	108.62	2063.87		

Tabla A8.1. Balances de materias del proceso *downstream*.

Anexo 9: Condiciones de temperatura y presión de las corrientes en el proceso.

Corriente	T(°C)	P(bar)	Corriente	T(°C)	P(bar)
1	21	1.01325	10b.1	20	1.01325
2	20	1.01325	10b.2	20	1.01325
3a.1	20	1.01325	11	20	1.01325
3a.2	65	500	12a.1	20	1.01325
3b			12a.2	21	1.5
4.1	65	10	13.1	17	1.01325
4.2	25	2	13.2	20	1.5
5	25	2	13.3	19	1.45
6.1	25	2	13.4	17	1.35
6.2	25	2	14a	19	1.45
6.3	27	2.5	14b.1	19	1.0325
7	25	2.5	14b.2	19	1.0325
8a.1	25	2.5	15	19	1.0325
8a.2	12	2.5	16.1	19	1.01325
8b.1	25	1.01325	16.2	19	1.01325
8b.2	25	1.01325	16.3	20	1.5
9	23	2.5	17	19	1.01325
10a.1	18	2.5	18	19	1.01325
10a.2	23	2.8	19	21	1.01325

Tabla A9.1 Temperaturas y presiones de las corrientes del proceso.

Anexo 10: Composiciones de las soluciones buffer en el arreglo de columnas cromatográficas de afinidad.

	Composición de las soluciones empleadas	pH	Volúmenes (CV)
Lavado Interconectado	Dihidrofosfato de sodio 50 mM, NaCl 1 M.	3.5	2
Lavado 1	NaH ₂ PO ₄ 28 mM y Na ₂ HPO ₄ 14 mM, NaCl 95 mM	7.1	2
Lavado 2	Buffer 1: Citrato de sodio 100 mM, NaCl 500 mM, HCl 12 mM	6	3
	Buffer 2: Citrato de sodio 54 mM, HCl 2 mM, pH 6	6	2.5
Elución	Citrato de sodio 5 mM y ácido acético 100 mM	3.5	3
Regeneración	100mM NaOH y 500mM NaCl		2
Reequilibrio	NaH ₂ PO ₄ 28 mM y Na ₂ HPO ₄ 14 mM, NaCl 95 mM	7.1	3
Total			103.62

Tabla A10.1. Composiciones de las soluciones buffer empleadas en los diferentes pasos de la columna cromatográfica de afinidad

Anexo 11: Código en Matlab para determinar las curvas de *breakthrough* en la columna cromatográfica de afinidad.

```
function [result, solution] = breakthroughLangmuirSingle()
%BREAKTHROUGHLANGMUIRSINGLE Breakthrough curve with 1 component
Langmuir model

% Step 1: Construct a system with general rate model
%   as main unit operation
% =====

% General rate model unit operation
mGrm = SingleGRM();

% Discretization
mGrm.nComponents = 1;
mGrm.nCellsColumn = 16; % Attention: This is very low and only used for
illustration (short runtime)
mGrm.nCellsParticle = 4; % Attention: This is very low and only used for illustration
(short runtime)
mGrm.nBoundStates = ones(mGrm.nComponents, 1); % Number of bound states for
each component

% Initial conditions (empty column)
mGrm.initialBulk = [0.0]; % [mol / m^3], also used for the particle mobile phase
mGrm.initialSolid = [0.0]; % [mol / m^3]

% Transport
mGrm.dispersionColumn = 5.75e-8; % [m^2 / s]
mGrm.filmDiffusion = [6.9e-6]; % [m/s]
mGrm.diffusionParticle = [6.07e-11]; % [m^2 / s]
mGrm.diffusionParticleSurface = [0.0]; % [m^2 / s]
mGrm.interstitialVelocity = 1.1111e-3; % [m/s]

% Geometry
mGrm.columnLength = 0.014; % [m]
mGrm.particleRadius = 4.5e-5; % [m]
mGrm.porosityColumn = 0.37; % [-]
mGrm.porosityParticle = 0.75; % [-]

% Adsorption
```

```

mLangmuir = LangmuirBinding();
mLangmuir.kineticBinding = true; % Kinetic binding
mLangmuir.kA      = [1.14]; % Adsorption rate [m^3 / (mol * s)]
mLangmuir.kD      = [0.002]; % Desorption rate [1 / s]
mLangmuir.qMax    = [4.88]; % Capacity [mol / m^3]
mGrm.bindingModel = mLangmuir;

% Specify inlet profile

% Reserve space: nSections x nComponents (a section can be thought of being a
% step in the process, see below)
mGrm.constant     = zeros(1, mGrm.nComponents);
mGrm.linear       = zeros(1, mGrm.nComponents);
mGrm.quadratic    = zeros(1, mGrm.nComponents);
mGrm.cubic        = zeros(1, mGrm.nComponents);

% Section 1: Loading phase
mGrm.constant(1,1) = 7.14e-3; % [mol / m^3] component 1

% Step 2: Create simulator and configure it
% =====

% Construct and configure simulator
sim = Simulator.create();
sim.solutionTimes = linspace(0, 10000, 1001); % [s], time points at which solution is
computed

% sectionTimes holds the sections and sectionContinuity indicates whether
% the transition between two adjacent sections is continuous
sim.sectionTimes = [0.0 10000.0]; % [s]
sim.sectionContinuity = [];

% Hand model over to simulator
sim.model = mGrm;

% Step 3: Run the model and plot the results
% =====

% Run the model
result = sim.run();

% Extract solution into a matrix with time being the first column

```

```
% Note that we need to extract the outlet of the first unit operation,  
% which is the general rate model (main unit operation is always first  
% in the SingleXYZ models)  
solution = [result.solution.time, squeeze(result.solution.outlet{1})];
```

```
% Plot the solution  
plot(solution(:, 1), solution(:, 2));  
legend('VLPs with 400 cm/h');  
grid on;  
xlabel('Time [s]');  
ylabel('Concentration [mol/m3]');
```

```
end
```


Anexo 12. PFD del proceso

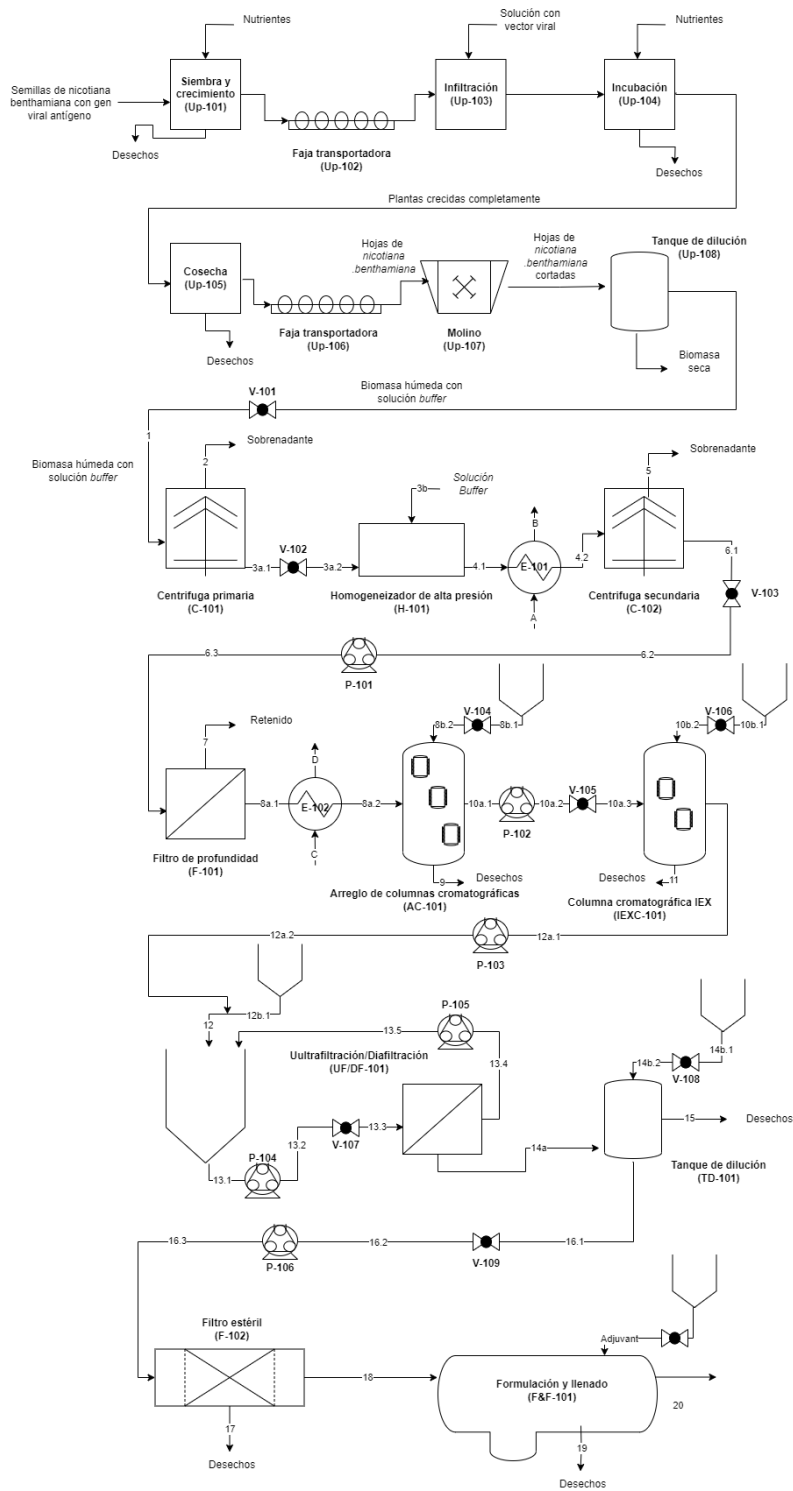


Figura A12.1. PFD del proceso propuesto.

Anexo 13: Resultados del análisis de sensibilidad del proyecto.

	CAPEX		Vaccine dose price	
	CapEx	VAN	Vial price	VAN
-25%	90818286	238323870.85	5.25	-381104473
-20%	96872838	233466770.57	5.60	-262075904
-15%	102927391	228609670.29	5.95	-143047336
-10%	108981943	223752570.01	6.30	-24018767
-5%	115036496	218895469.73	6.65	95009801
0	121091048	214038369.45	7.00	214038369.45
5%	127145600	209181269.17	7.35	333066938
10%	133200153	204324168.89	7.70	452095506
15%	139254705	199467068.61	8.05	571124075
20%	145309258	194609968.33	8.40	690152643
25%	151363810	189752868.05	8.75	809181212

Tabla A.13.1. Resultados del análisis de sensibilidad del proyecto.

	Costo Nicotiana benthamiana		Dosis per batch	
	Scale	VAN	Scale	VAN
-25%	2705254.31	231087022	13490909	-381104473
-20%	2885604.60	227677291	14390303	-262075904
-15%	3065954.89	224267561	15289697	-143047336
-10%	3246305.18	220857830	16189091	-24018767
-5%	3426655.46	217448100	17088485	95009794
0	3607005.75	214038369	17987879	214038369
5%	3787356.04	210628639	18887273	333066938
10%	3967706.33	207218909	19786667	452095506
15%	4148056.61	203809178	20686061	571124075
20%	4328406.90	200399448	21585455	690152643
25%	4508757.19	196989717	22484849	809181212

Tabla A.13.2. Resultados del análisis de sensibilidad del proyecto.

