

Dimensionamiento del sistema de microfiltración para la producción de la Vacuna Pertussis elaborada en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Microfiltration sistem dimension for using in Pertussis Vaccine toxin production in the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

JOSÉ G SANTIAGO D¹, NELSON C ZAMORA¹, NORIEGA QUINTANA¹ Y GABRIEL OLMO²

RESUMEN

Se evaluó el uso de la tecnología de Flujo de Filtración Tangencial (FFT), para obtener la Vacuna Pertussis Celular a partir de cultivos de la bacteria *Bordetella pertussis*, usando el proceso de Microfiltración (MF) a objeto de recuperar el paquete celular. Se determinaron las características de los filtros, condiciones de trabajo y el dimensionamiento del equipo a adquirir para la nueva producción industrial de Vacuna Pertussis Celular. Se evaluaron el flujo y tiempo de proceso, rendimiento y las características del producto obtenido. Utilizando cultivos con Vacuna Pertussis en un equipo de filtración de laboratorio, diseñado para producir el efecto de FFT. Se seleccionó las membranas tipo cassettes, formato Suspended Screen, porosidad 0,2 µm, como las adecuadas para el proceso de MF, ya que mostraron un 100% de recuperación del paquete celular sin transmisión de células al filtrado y con un flujo promedio de filtrado de 54.00 L/m²h. Estos resultados permitieron dimensionar, considerando las variables a utilizar en la nueva producción industrial (Volumen 650 Litros, Tiempo de Procesos, 3 a 4 horas), el área de filtración del equipo de MF a adquirir, estimado en 20 m².

Palabras clave: Vacuna Pertussis Celular, Separación Celular, Microfiltración.

ABSTRACT

Tangential Flow Filtration (TFF) technology was evaluated to process Whole Cell Pertussis Vaccine which is produced by *Bordetella pertussis* bacterium. Microfiltration (MF) is used to recovery cells to produce the vaccine. MF processes was evaluated to specify the filters and corresponding critical process parameters to scale-up the application. As part of the evaluation, flow rate, processing time, yield and product attributes were characterized. The cell harvest containing the Whole Cell Pertussis was processed using a laboratory scale TFF system designed to product the TFF effect. The evaluation demonstrated that a cassette in suspended screen format and membrane with 0.2µm pore is the right selection for the MF step. It showed 100% of cell recovery without cell transmission to the filtrate and average process flux of 54.00 L/m²h. These results were used to scale-up the application to process the industrial volume of 650 liters in 3 hours of processing time. Membrane area sizing of MF to be acquired is estimated in 20 m².

Key words: Whole Cell Pertussis, Cell Separation, Microfiltration.

¹ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", División de Producción de Vacunas Bacterianas.

² Pall Corporation, Puerto Rico.

INTRODUCCIÓN

La Vacuna Pertussis Celular consiste en una suspensión de una o más cepas de células inactivadas de la bacteria *Bordetella pertussis* a objeto de completar el mosaico completo de los antígenos identificados como 1, 2 y 3⁽¹⁾. Su actividad biológica puede ser inhibida con tratamiento térmico o agregando formaldehído⁽²⁾ al cultivo sin destruir la integridad celular y la estructura de las proteínas y así obtener la Vacuna Pertussis Celular, la cual es utilizada como antígeno para la formulación de la Vacuna Combinada DPT (Toxide Diftérico, Vacuna Pertussis y Toxide Tetánico), producida en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR)⁽³⁾.

Con el fin de incrementar la capacidad de producción, actualizar la tecnología e incursionar en nuevos mercados, el INHRR está construyendo una nueva planta para la producción de Vacunas Simples y Combinadas inactivadas en base a la Vacuna DPT, con una capacidad de producción estimada en 42.000.000 de dosis anuales de Vacuna Pertussis Celular. Esto implica un aumento significativo en la producción, un cambio de tecnología y por ende una selección de los equipos a utilizar para la separación celular y concentración de la proteína, a objeto de dimensionar el equipamiento adecuado cónsono con los criterios de calidad internacionales que rigen la producción de Biológicos.

Para la obtención de la Vacuna Pertussis Celular, es necesario recuperar las células obtenidas durante el proceso de producción en fermentadores. Este proceso consiste en la eliminación del medio líquido y la recuperación y concentración de las células presentes en dicho medio líquido a través de un proceso denominado MF^(2,4).

En este sentido, se realizaron pruebas piloto utilizando diferentes formatos de membranas elaboradas con Polietersulfona (PES), con el fin de determinar el flujo y tiempo de proceso, rendimiento y características del producto obtenido y de esta manera dimensionar el área de filtración del equipo para realizar el proceso de MF de la Vacuna Pertussis Celular a ser adquiridos para la Nueva Planta de Producción de Vacunas del INHRR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacuna Pertussis Celular:

Se utilizaron las cepas liofilizadas 134 y 509 de la bacteria *Bordetella pertussis*, para la producción de la Vacuna Pertussis Celular siguiendo los procedimientos descritos por Santiago⁽¹⁾. Se utilizó el lote B-131 de la

Vacuna Pertussis Celular para realizar las pruebas de MF.

Pruebas de Control

La concentración de la Vacuna Pertussis Celular se determinó utilizando la técnica de Unidades de Opacidad por mililitro (Uop/ml)⁽⁵⁾, donde se mide el grado de turbidez que presenta la vacuna, a través de un Espectrofotómetro "Spectronic 20" a una longitud de onda de 530 nm, comparado con la preparación de la Referencia Internacional de Opacidad la cual corresponde a 10 Uop/ml y puede ser considerado, para propósitos prácticos, el equivalente a 10×10^9 células/ml.

Transmisión de Células al Filtrado

La presencia de células en los procesos de filtración fue evaluada observando las muestras en un microscopio óptico a 100X. Es importante señalar, que esta prueba no fue realizada para determinar pureza del cultivo sino transmisión de células a través de las membranas.

Pruebas de MF

Las pruebas de MF se realizaron en un equipo de laboratorio Centramate, suministrado por la empresa Pall Corporation, compatible con todos los formatos de membranas de las principales firmas comerciales del mercado, el cual es diseñado y construido para producir el efecto de FFT en membranas, formato tipo cassettes, con un área de filtración de 0.1 m² por cassette. Se seleccionaron membranas nuevas de diferentes formatos y porosidades de la firma Pall, en virtud que no se tiene experiencia en el uso de estas membranas para la producción de toxina diftérica, siguiendo las condiciones de trabajo que se especifican en la tabla 1. Para realizar cada prueba de MF se utilizaron 6 Litros del cultivo obtenido directamente del proceso de producción de la Vacuna Pertussis Celular a una concentración de 50 Uo/ml.

Para la realización de las pruebas de MF, se ensambló un sistema como se observa en la figura 1. Se colocó el producto a filtrar en el Envase correspondiente y por medio de una bomba peristáltica, se hizo pasar dicho producto a través de la unidad de filtración, donde se instalaron los diferentes formatos de los filtros a probar. Por la línea de Producto filtrado, debe pasar el producto que ha atravesado el filtro (transmisión) y por la Línea de Producto Retenido debe retornar al Envase inicial, el producto que no pudo ser filtrado. La presión de entrada

Tabla 1
Características de las membranas y condiciones de trabajo establecidas para las pruebas de MF

Producto a filtrar	Proceso Evaluadas	Formatos y porosidades (Bar)	PE (Bar)	PR (Bar)	DP (Bar)	PF (Bar)	PTM
Cultivo de <i>Bordetella pertussis</i>	MF	- Medium Screen (MS) Supor 0,2 µm	2	0	2	0	1
		- Suspended Screen (SS) Supor 0,2 µm	1.1	0.2	0.9	0	0,65

(PE) se estableció con el manómetro instalado en la Línea de Alimentación, entre la bomba y el módulo del filtro. La presión de Retorno (PR) se estableció con el manómetro instalado en la Línea de Producto Retenido, entre el filtro y la Válvula de retorno. La Diferencia de Presión (DP) es la resta entre PE y PR. La Presión de Filtrado (PF) se estableció con el manómetro instalado en la Línea de Producto Filtrado, entre el filtro y la válvula de filtrado. La Presión Transmembrana (PTM) se estimó como el resultado obtenido al promediar los valores de las PE y PR y restarlo al valor obtenido en el manómetro ubicado en la Línea de Filtrado. El flujo del filtrado se determinó dividiendo el valor obtenido en el flujómetro instalado en la Línea de Producto Filtrado, entre el área de filtración del cassette. El Flujo Promedio de Filtrado se calculó promediando los valores del flujo del filtrado obtenidos durante el proceso de filtración.

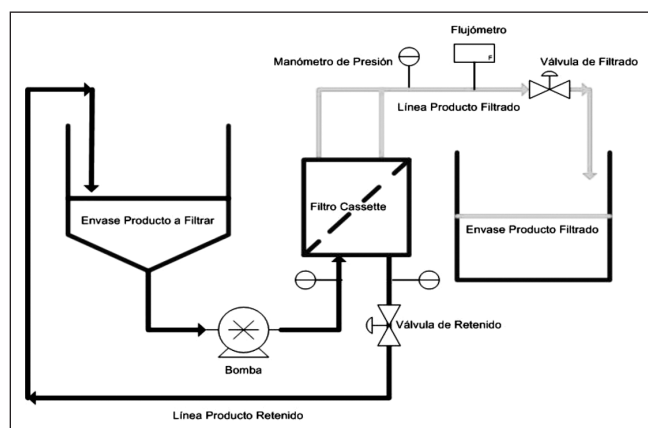


Figura 1. Diagrama esquemático del diseño para la realización de las pruebas de MF y UF.

Las pruebas a realizar consistieron en determinar el efecto del tiempo y de la PTM sobre el flujo de proceso, para lo cual se recirculó todo el sistema, colocándose las Líneas de Retorno de Productos y de Filtrado de Produc-

to en el Envase de Producto a Filtrar, estableciéndose las condiciones según lo indica cada ensayo. Posteriormente y con el valor de la PTM establecido, se realizó el efecto de la concentración del Producto a Filtrar sobre el flujo de proceso, lo que constituye el proceso de filtración de la Vacuna Pertussis Celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la obtención de la Vacuna Pertussis Celular una vez culminado su proceso de producción en fermentadores, es necesario realizar la recuperación de las bacterias obtenidas en el cultivo. Este proceso puede realizarse de diferentes maneras: usando centrifugas de flujo continuo, filtración convencional con cartuchos o membranas, o filtración usando la tecnología FFT. Esta tecnología consiste en someter al cultivo a un proceso de filtración de forma tangencial (no de forma directa como en el caso de la filtración convencional), lo cual permite que las membranas no se colapsen por el taponamiento prematuro producto de la formación de depósitos celulares que ocurren durante la interacción con la membrana (polarización), debido al limitado espacio que hay en los canales por donde circula el fluido. Con la FFT es posible utilizar mayores cantidades de volúmenes de producto por área de filtración, con velocidades constantes de flujo de trabajo en el tiempo. La incorporación de esta tecnología permite realizar el proceso de separación celular de forma más limpia, segura y en menor tiempo, en virtud que es posible conectar el equipo con Tecnología de FFT en un circuito cerrado con el fermentador y de esta manera minimizar los riesgos de contaminación del producto o del operario durante la manipulación del proceso, lo cual es una condición indispensable para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en la producción de Biológicos⁽²⁾.

Para la realización de las pruebas de MF, se seleccionaron las membranas Supor (rango de trabajo desde 0.1 hasta 1.2µm), fabricadas en PES, formatos Medium Screen (MS) de 0.2 µm y Suspended Screen (SS) 0.2 µm.

Las membranas de polyetersulfona (PES) son membranas construidas con polímeros de PES pura. Este material permite eliminar partículas durante los procesos de filtración general y sus características hidrofílicas y de baja fijación de las proteínas las hacen especialmente apropiada para su uso en aplicaciones biomédicas⁽⁶⁾. El formato MS permite el procesamiento de fluidos clarificados de mediana o baja viscosidad, en cambio el formato SS, permite el procesamiento de fluidos no clarificados como cosechas celulares provenientes de fermentadores, así como también soluciones con detritos o partículas no solubles y de alta viscosidad. El efecto de suspendido se crea incorporando al diseño de construcción del cassette, un espaciador de poliofelina (180 µm), entre la malla de poliéster (Screen) y la membrana⁽⁷⁾.

Los resultados del efecto del tiempo sobre el flujo de proceso (ver gráfico 1), mostraron una disminución proporcional del flujo de proceso a medida que transcurrió el tiempo de corrida, para todos los formatos de membranas probados. Ello es debido a la polarización de la membrana, lo cual disminuyó progresivamente sus capacidades de filtración, siendo el formato SS 0.2 µm, el que mostró mejor comportamiento en el tiempo. Por otra parte, a medida que se incrementó la PTM, desde 0.25 hasta 1.5 Bar (ver gráfico 2), se observó un aumento significativo del flujo de proceso con la membrana formato SS de 0.2 µm hasta alcanzar una PTM de 1 Bar. Valores superiores de la PTM, mostraron una leve disminución del Flujo de Procesos. El formato MS de 0.2 µm, mostró valores de flujos de proceso inferiores y estables durante el ensayo. Los efectos de polarización se alcanzaron cuando la PTM superó el valor de 1.0 Bar, por lo que se estableció valores iguales o inferiores a 1.0 bar para los siguientes ensayos.

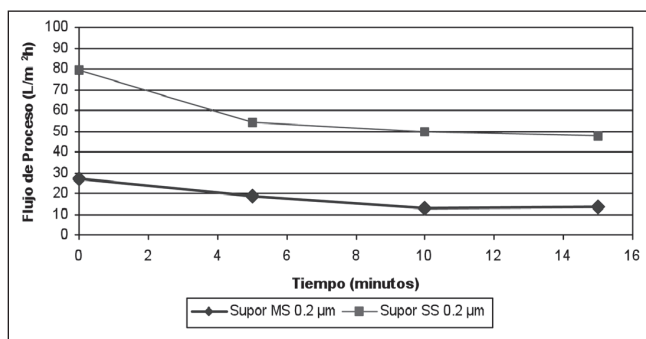


Gráfico 1

Pertussis MF. Flujo de Proceso vs Tiempo.
Pertussis Celular: 50 Uo/ml, PTM 0.25 Bar, DP 0.5 Bar, 25°C

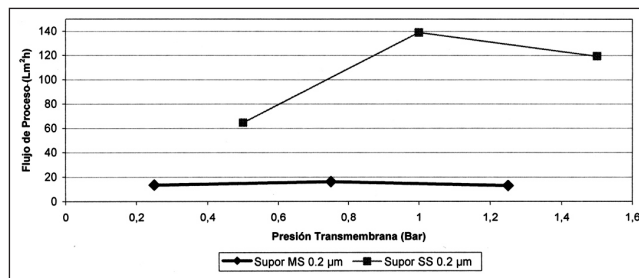


Gráfico 2

Pertussis MF. Flujo de Proceso vs PTM.
Pertussis Celular: 50 Uo/ml, DP 0.5 Bar, 25°C

Para cada uno de los formatos de los filtros empleados en el proceso de MF, se establecieron las condiciones que se indican en el gráfico 3, con el fin de determinar como se afecta el Flujo de Proceso a medida que se va concentrando el producto en el Envase de Producto a filtrar, como consecuencia del retorno de las células al mismo. En el gráfico 3, se puede observar para los dos formatos, que a medida que se va concentrado el producto a filtrar, no se observa un efecto significativo de polarización de la membrana, lográndose alcanzar en ambos caso un factor de concentración de 20 X, sin embargo el flujo de proceso de la membrana formato SS, duplica los valores obtenidos con el formato MS.

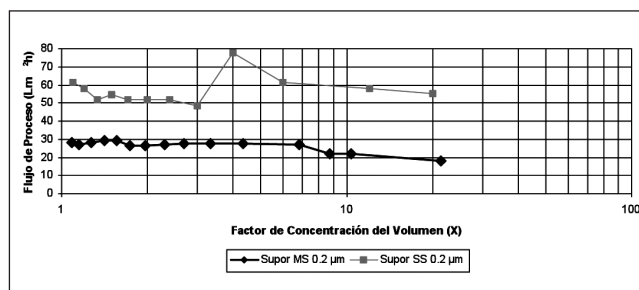


Gráfico 3

Pertussis MF. Flujo de Proceso vs Factor de Concentración del Volumen.
Pertussis Celular 50 Uo/ml, 25°C. MS (PTM 1.0 Bar, DP 2.0 Bar). SS (PTM 0.65 Bar, DP 0.9 Bar)

Los resultados obtenidos indicaron que el cassette, formato MS 0.2 µm, aunque presentó un flujo promedio de filtrado aceptable (21.00 L/m²h) y ausencia de células en el filtrado, no fue considerado en virtud que sólo se pudo recuperar un 85% de las células en el retenido, por lo que se sugirió realizar un tercer lavado para recuperar

el resto de las células, incrementándose el tiempo de proceso. El cassette, formato SS 0.2 μm , presentó un mejor flujo promedio de filtrado (54.00 L/m²h), 95% de recuperación de las células en el retenido y ausencia de células en el filtrado, indicando que desde el punto de vista de la porosidad y compatibilidad, cumple con las especificaciones requeridas.

El comportamiento observado en ambas membranas, se atribuye al tamaño de las células, las cuales permanecen en su mayoría en su forma integral ejerciendo un efecto de polarización de la membrana en el tiempo, los cuales a medida que interaccionan con la membrana se van depositando, limitando el proceso de filtración y por ende disminuyendo la recuperación de las mismas, razón por la cual es importante realizar lavados posteriores para recuperar la totalidad de las células, favoreciendo, de esta manera, a la membrana formato SS 0.2 μm por el flujo promedio de filtrado alcanzado.

Estos resultados demostraron que la membrana, formato SS 0,2 μm , es la seleccionada para realizar el procedimiento de separación celular de la Vacuna Pertussis. En este sentido y tomando en consideración los resultados obtenidos, se dimensionó el área de filtración para el equipo de MF de acuerdo a la siguiente formula:

Formula 1.

$$\text{Área (m}^2\text{)} = \frac{\text{Volumen de procesamiento a escala industrial (L)}}{\text{Flujo medio en estudio piloto (L/hm}^2\text{)} \times \text{Tiempo deseado}}$$

Donde:

Volumen total a procesar en la nueva planta de producción de la Vacuna Pertussis, considerando 50 L Inoculo, 500L Medio Fermentador, 5 lavados a razón de 20L cada uno 100 L, Total: **650 L**. Tiempo de procesamiento deseado: **3 h**. Flujo medio de trabajo estimado por este estudio para la membrana, formato SS 0.2 μm : 54.00 L/hm².

Por lo tanto, el área de filtración calculada para el equipo de MF es de: **4.01 m²**, tomando un factor de seguridad del 20 % de área, quedaría: **4.81 m²**. Entonces, y considerando que la máxima concentración posible a obtener de la Vacuna Pertussis Celular en Bioreactores

es de 92 Uo/ml, el equipo de MF a ser adquirido por el INHRR para realizar el proceso de separación celular de la vacuna Pertussis, debe ser un modelo de sistema de MF, diseñado y construido para un área máxima de filtración de **20.00 m²**.

Con los resultados obtenidos en este trabajo y la experiencia de los actuales procesos de producción en vacunas similares desarrollados en los Institutos Finlay (Cuba) y Butantan (Brasil), se probaron las membranas específicas usadas por dichas instituciones, tanto en MF como en UF de otras firmas comerciales reconocidas, obteniéndose resultados similares a las membranas seleccionadas en este trabajo (datos no reportados), lo que permitió identificar los formatos específicos de todas las membranas de las firmas comerciales reconocidas, que son compatibles con la producción de la toxina diftérica elaborada en el INHRR, a objeto de disponer de diferentes opciones técnicas y económicas en el momento de adquirir dichas membranas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Santiago JG, Zamora N, De La Rosa E, Carrión C, Padrón P, Hernández M, et al. Optimización del Proceso de Producción de la Vacuna Pertussis. Acta Cient. Venez. 1995 46 (2): 129-134.
- (2) Cardoso D. Paquete Tecnológico para la obtención de vacunas bacterianas con un enfoque de proceso unitario. Tesis Doctoral, Instituto Superior Politécnico, Cuba. 2000.
- (3) Santiago JG, Zamora N, Ibarz MT y Pombo M. Evaluación y mejoramiento del aspecto físico de las Vacunas Pertussis y DPT elaboradas en el INHRR. Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel. 1998; 29: 41-49.
- (4) Van Hemert P. Vaccine production as a unit process. Rijks. Instituut voor de Volksgezondheid. Vaccine Department, Bilthoven, Netherlands 1971, 76-101.
- (5) World Health Organization. Manual for the production and control of vaccines. Pertussis vaccine BLG/UNDP/77.3. Rev. 1, 1977.
- (6) Howel JA, Sánchez V, Field RW. Membranes in bioprocessing: theory and applications. Chapman & Hall. London 1993. 203-242.
- (7) Mulder M. Membrane processes. Chapter VI. In: Basic principles of membrane technology, second edition, Kluwer Academic Publishers, 1996. 280-306.