

Aplicación del Análisis de Componentes Principales en el proceso de fermentación de un anticuerpo monoclonal

Liber Mesa-Ramos,^{1*} Osvaldo Gozá-León,^{1**} Maidelys Uranga-Machado,² Arturo Toledo-Rivero,³ Yaritza Gálvez-Torriente³

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”. La Habana, Cuba.

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

³ Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

email: ogoza@quimica.cujae.edu.cu

En el Centro de Inmunología Molecular (La Habana, Cuba) se produce un anticuerpo monoclonal terapéutico que ha encontrado una efectiva aplicación en el tratamiento de pacientes aquejados de cáncer de cabeza y cuello. Dada la gran variabilidad que ha tenido la concentración de este anticuerpo en la etapa de fermentación industrial de la planta donde es producido, se hizo necesaria la aplicación de una técnica de análisis multivariante como el Análisis de Componentes Principales, con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos y de explicar las principales fuentes de variabilidad del proceso. Para llevar a cabo el Análisis de Componentes Principales mediante el programa *THE UNSCRAMBLER* se partió de la determinación de los parámetros críticos de la etapa de fermentación a través de un modelo de riesgo basado en matriz de entradas y salidas empleando los datos de la campaña realizada en el año 2014. Como resultado se obtuvo que dos componentes principales logran explicar más del 99% de la varianza total, y se logró definir cuáles son los parámetros críticos que mayor aporte tienen a la variabilidad del proceso de fermentación. Dichos resultados corroboraron experiencias prácticas de especialistas de la planta y permitieron dar recomendaciones a considerar en el Plan de Verificación Continuada del Proceso, como proponer la inclusión en la estrategia de control del proceso a la temperatura, la velocidad de agitación, el oxígeno disuelto y el tiempo de duración del cultivo.

Palabras clave: anticuerpo monoclonal, fermentación, Análisis de Componentes Principales, parámetros críticos.

Introducción

El desarrollo de procesos de producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos está presentando una transición, dada por la evolución en el ámbito regulatorio y la amplitud de aplicaciones generadas por la biotecnología. En este contexto la industria farmacéutica está abordando las metodologías de calidad por diseño (*Quality by Design, QbD*) promovidas por las agencias regulatorias en el mundo (1).

El concepto de espacio de diseño se incluye en varios aspectos del desarrollo y manufactura de biofármacos, como son la etapa de caracterización, optimización, validación, manufactura comercial y registro sanitario y se puede definir como la combinación multidimensional y la interacción de las variables de entrada y los parámetros de proceso para demostrar el cumplimiento de los atributos de calidad (2). Consta de varias etapas que permiten establecer el espacio de diseño que

delimita los intervalos de operación, control y alerta de cada uno de los parámetros del proceso.

En este sentido el Centro de Inmunología Molecular (CIM), institución exponente de la biotecnología cubana, se encamina a verificar el espacio de diseño y actualizar el espacio operacional de productos que han sido registrados anteriormente con otra concepción, así como a enriquecer la proyección hacia un Plan de Verificación Continuada del Proceso.

Uno de los productos principales de este centro ha encontrado una elevada aplicación en el tratamiento de pacientes aquejados de cáncer de cabeza y cuello (3).

El proceso productivo de obtención de este anticuerpo consta de una etapa de fermentación seguida de una etapa de purificación. Para este producto, bajo el enfoque actual, es necesario retomar la definición de los parámetros críticos que conforman el espacio de diseño de su proceso productivo a escala comercial, presentándose variaciones significativas en cuanto a

* Ingeniero Químico y Profesor de Ingeniería Química.

** Ingeniero Químico, Profesor y Máster en Ingeniería de Procesos Biotecnológicos (autor para la correspondencia).

la concentración del producto al final de la etapa de fermentación inherentes a las complejidades del modo de perfusión (4-6).

Por otro lado, debido al nivel de automatización en esta producción, se dispone de grandes volúmenes de información registrada. Toda esta memoria histórica pudiera procesarse, lo cual hace atractivo el empleo de técnicas de análisis multivariante de datos con el objetivo de extraer información útil, lo que permite arribar a conclusiones acerca del comportamiento del proceso y lograr un mayor entendimiento del mismo.

En los procesos de fermentación existen muchas variables relacionadas entre sí, de ahí que se requiera de métodos que puedan procesar simultáneamente múltiples variables y que no sólo revelen las variables más influyentes, sino que también reflejen la existencia de correlaciones y otras complejidades (5, 6).

Un método de análisis multivariante de gran utilidad para explicar las fuentes de variabilidad de un proceso y reducir dimensionalidad de los datos, es el Análisis de Componentes Principales (ACP). Este método transforma la información multidimensional en unas pocas variables que explican una gran parte de las fluctuaciones de las variables originales, así como sus interrelaciones (7-9).

Materiales y Métodos

Para seleccionar las variables a considerar en el ACP, se procedió previamente a determinar los atributos críticos de calidad del sobrenadante y a partir de los mismos mediante una matriz de entrada-salida basada en riesgo, los parámetros críticos en la etapa de fermentación industrial. El presente trabajo se centró en el análisis del fermentador industrial, el cual opera en modo perfusión.

Determinación de los atributos críticos de calidad del sobrenadante cosechado y almacenado

Los atributos críticos de calidad se identificaron en el sobrenadante cosechado y almacenado. Se definieron como las propiedades químicas, físicas, biológicas y microbiológicas del sobrenadante que pudieran tener un impacto sobre el desempeño del proceso de purificación, reflejándose negativamente en la calidad del producto final con capacidad de ser o no detectable, poniendo en riesgo la salud del paciente.

La identificación de los atributos críticos de calidad y la determinación de su nivel de criticidad parte de la clínica del producto y los riesgos inherentes a la seguridad de

los pacientes, y se realizó mediante una valoración de criticidad/riesgo, basada en la información disponible del proceso a diferentes escalas, así como en su conducción a escala comercial, incluyendo los eventos de desviación, controles de cambios y los estudios de estabilidad del producto.

Para la asignación del nivel de criticidad a cada atributo crítico identificado, se tomó como criterio el impacto potencial sobre el desempeño de los procesos de purificación posteriores y su posible influencia negativa en la calidad del producto final, además en la capacidad de ser detectado y en la existencia o no de riesgo para la seguridad de los pacientes. Sobre la base del conocimiento y la experiencia del proceso se valoró el nivel de criticidad de los atributos de calidad del sobrenadante, para ello se elaboraron previamente y bajo consenso tablas de asignación de índices. A estos se les asignó un índice de la siguiente manera: 7 para nivel de criticidad muy alto, 5 para nivel alto, 3 para nivel medio y 1 para el nivel bajo.

Determinación de los parámetros críticos en la etapa de fermentación

Los parámetros críticos del proceso son aquellos cuya variabilidad tiene un impacto en uno o varios atributos críticos de calidad y por lo tanto debe ser controlado para asegurar la calidad de las producciones.

Aunque en esta investigación se determinaron los parámetros críticos de todas las etapas del proceso de fermentación que anteceden a la cosecha y almacenamiento del sobrenadante, solo se consideraron para los análisis posteriores los parámetros críticos determinados en la etapa de fermentación en la escala productiva por la preponderancia de este paso en la formación del producto.

A partir de un trabajo en equipo con personal de gran experiencia del proceso y la planta, y considerando toda la información disponible relacionada con el desempeño del proceso, se seleccionaron todos los parámetros que se consideraban fundamentales, teniendo en cuenta su influencia en las etapas posteriores y en los atributos críticos del sobrenadante.

Fueron consultados cinco especialistas relacionados con el trabajo de la planta en función de tecnólogos o responsabilizados con las operaciones en el área de fermentación. Todos son Ingenieros Químicos, dos de ellos con más de 10 años de experiencia laboral, los restantes con más de 5 años, vinculados al área de

fermentación. Uno es Doctor en Ciencias Técnicas y dos poseen el grado de Maestro en Ingeniería de los Procesos Biotecnológicos.

Las etapas consideradas fueron las siguientes:

- Expansión celular (descongelación, expansión en frascos estacionarios y en frascos agitados)
- Fermentación en biorreactor de inóculo
- Fermentación en biorreactor industrial
- Cosecha y almacenamiento

Se le asignó un índice de criticidad a cada parámetro en función de la influencia de su variabilidad sobre cada atributo crítico determinado. Con el nivel de criticidad de cada atributo crítico de calidad y el índice asignado a cada parámetro (7 para nivel de criticidad alto, 5 para nivel medio, 3 para nivel bajo y 1 para el nivel nulo), se determinaron la suma de los productos por cada uno en la fila de la matriz correspondiente y su porcentaje respecto al total, lo que da medida del impacto de cada parámetro sobre cada atributo de calidad, de esta forma aplicando el criterio de Pareto quedan definidos los parámetros críticos.

Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales se realizó empleando la versión 8.0 del software *THE UNSCRAMBLER*, el cual constituye un programa especialmente concebido para análisis multivariante de datos. Este programa brinda una visión general de los resultados, integrada por cuatro gráficos fundamentales para el entendimiento e interpretación de la información obtenida: gráfico de la varianza explicada, gráfico de la influencia, gráfico de las puntuaciones y gráfico de los pesos o mapa de las variables.

Resultados y Discusión

Determinación de los atributos críticos de calidad del sobrenadante y los parámetros críticos en la etapa de fermentación

En la Tabla 1 se muestran los parámetros del proceso de fermentación considerados en el análisis de riesgo con su identificación. Con el nivel de criticidad de cada atributo y el índice asignado a cada parámetro, se determinaron la suma de los productos por cada parámetro en la fila de la matriz correspondiente y su porcentaje respecto al total, lo que da medida del impacto de cada parámetro sobre cada atributo de calidad.

Como resultado quedó conformada la matriz entrada-salida con la que posteriormente se confeccionó un gráfico de barras con los índices de impacto de cada parámetro y su porcentaje acumulativo en forma descendente tipo Pareto, el cual se muestra en la Figura 1.

A partir de este gráfico y aplicando el criterio de Pareto 80%-20%, fueron identificados los parámetros críticos por etapas, de los que en la Tabla 2 solo se muestran los correspondientes a la etapa de la fermentación a escala industrial. El resto de los parámetros que no resultaron críticos fueron clasificados como claves, los mismos tienen influencia sobre el desempeño del proceso, pero no afectan los atributos críticos de calidad del producto.

Una vez identificados los parámetros críticos de la etapa de fermentación a escala industrial se procedió a realizar el Análisis de Componentes Principales tomando los valores registrados de estas variables correspondientes a los lotes producidos en el año 2014. Se conformó una matriz que contenía 11 variables (los diez parámetros críticos determinados mediante la matriz de entrada-salida y la concentración de producto como función objetivo) y 159 muestras o instancias correspondientes a los siete lotes realizados en el año que se analizó. El ACP se realizó con las 159 muestras de los diez parámetros críticos, para un total de 1590 puntos experimentales considerados.

La heterogeneidad de los datos, motivada por la presencia de variables de diferente naturaleza y diferentes magnitudes, conllevó la aplicación del autoescalado y la normalización de los datos como parte del preprocesamiento. La combinación de la normalización por el rango seguido del autoescalado fue la que mejores resultados arrojó en el ACP (9).

Como resultado del preprocesamiento descrito, la variable X_v fue excluida del análisis al tomar un valor unitario y constante después de la normalización, lo cual significa que la misma no tiene un aporte significativo a la variabilidad del proceso y por tanto no sale a relucir en el modelo descriptivo del ACP. Dicha variable, de gran relevancia en la fermentación, sí tiene que ser considerada en el establecimiento de modelos predictivos de la concentración del producto de interés, tarea emprendida en trabajo posterior.

Resultados del ACP

A partir del procesamiento de los datos con el programa *THE UNSCRAMBLER*, se determinó que con un componente principal se logra explicar el 96,91% de la

Tabla 1. Lista de parámetros considerados en el proceso de fermentación.

Id.	Parámetro	Id.	Parámetro
	Cosecha y almacenamiento del sobrenadante	25	Viabilidad celular
1	Temperatura de almacenamiento	26	Concentración de células vivas
2	Tiempo de almacenamiento	27	Concentración de nutrientes
	Fermentación biorreactor a escala comercial	28	Osmolalidad del medio de cultivo
3	Temperatura	29	Presión
4	pH		Expansión en frascos <i>Rollers</i>
5	Viabilidad celular del inóculo	30	Temperatura
6	Concentración de células vivas en el inóculo	31	Concentración de nutrientes en el medio de cultivo
7	Concentración de oxígeno disuelto	32	Osmolalidad del medio de cultivo
8	Duración del cultivo	33	Viabilidad celular
9	Osmolalidad del medio de cultivo	34	Concentración de células vivas
10	Flujo de medio de cultivo	35	Velocidad de agitación
11	Concentración de nutrientes		Expansión celular frascos <i>T</i>
12	Eficiencia del filtro de perfusión	36	Temperatura
13	Concentración de células vivas	37	Concentración de nutrientes
14	Viabilidad celular	38	Osmolalidad del medio de cultivo
15	Velocidad de agitación	39	Viabilidad celular
16	Velocidad específica de crecimiento de la biomasa	40	Concentración de células vivas
17	Velocidad específica de formación del producto de interés		Descongelación
18	Presión	41	Velocidad de centrifugación
	Fermentación biorreactor de inóculo	42	Tiempo de centrifugación
19	Temperatura	43	Temperatura
20	pH	44	Actividad biológica
21	Velocidad de agitación	45	Viabilidad celular
22	Concentración de oxígeno disuelto	46	Concentración de células vivas
23	Duración del cultivo	47	Concentración de IgG
24	Flujo de medio de cultivo		

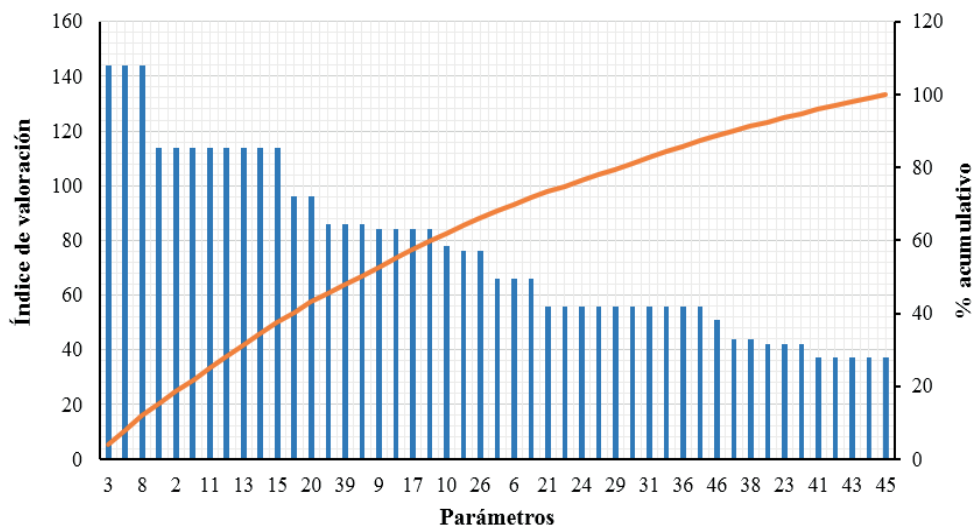
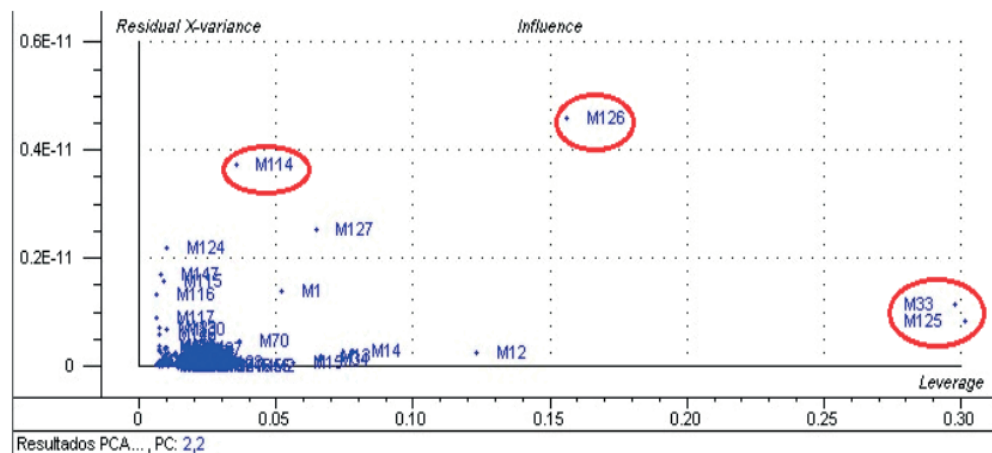


Fig. 1. Gráfico de valoración de parámetros críticos a partir del criterio de Pareto.

Tabla 2. Parámetros críticos de la etapa de fermentación a escala industrial.

No.	Parámetro crítico	Notación	Unidad de medida
1	Temperatura	T	°C
2	Tiempo de duración del cultivo	t	días
3	Viabilidad celular	Viab	%
4	Equilibrio ácido-base (pH)	pH	adimensional
5	Velocidad específica de crecimiento de la biomasa	Vc	h ⁻¹
6	Velocidad específica de formación del producto de interés	qp	µg/cel*mL
7	Flujo de medio de cultivo	F	L/min
8	Concentración de células vivas	Xv	cel/mL
9	Velocidad de agitación del agitador	rpm	min ⁻¹
10	Oxígeno disuelto	DO	%
11	Concentración del producto de interés	IgG	µg/mL

**Fig. 2.** Gráfico de la influencia en el ACP del año 2014.

varianza total de los datos, lo cual es un índice de la alta correlación que existe entre las variables estudiadas. Con el segundo componente se logra explicar hasta el 99,38% de la variabilidad total del proceso.

En la Figura 2, se pueden observar muestras con elevado error residual (M114 y M126) y muestras con elevado distanciamiento del comportamiento del resto de las muestras (M33 y M125); estas muestras constituyen puntos discrepantes (outliers) pero no son peligrosos, por lo que no fueron eliminadas del modelo al contener información útil del proceso.

En el gráfico de las puntuaciones (Fig. 3) se puede observar que la mayoría de las muestras se encuentran dentro de la elipse de Hotelling, lo cual indica que no hay tendencias adicionales no inherentes al propio proceso, con algunas dispersiones que pueden estar dadas por pequeños cambios operacionales. Sin embargo, aquellas muestras que caen fuera de la elipse

persiguen un comportamiento diferente a las demás, mostrando condiciones del proceso muy particulares. Estas son: la M12, M14, M33, M34, M125 y M126. Son consideradas puntos discrepantes.

La muestra M12 indicó el inicio de la operación en modo continuo, luego de haber sido detenida la operación en perfusión para la realización de una purga profunda quedando el fermentador al 50% de su volumen de trabajo; se completó hasta el 100% en modo de operación discontinuo, arrancándose entonces la operación continua sin recirculación de células.

La muestra M14 indicó el comienzo de la perfusión por el filtro rotatorio 1, luego de haber estado operando en modo continuo sin recirculación de células.

Las muestras M33 y M34 indicaron el comienzo del modo continuo con perfusión luego de haberse detenido para realizar una purga profunda en la cual se dejó

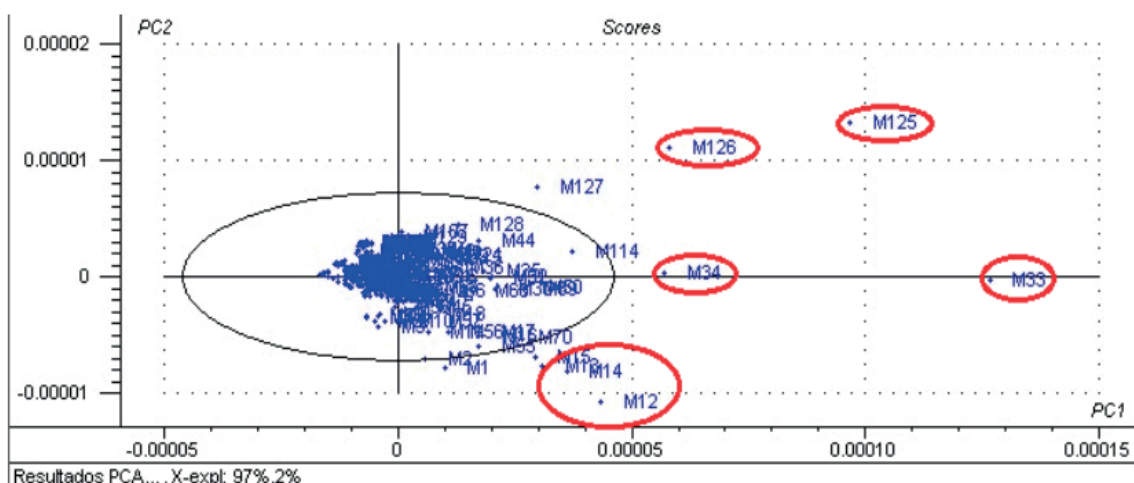


Fig. 3. Gráfico de las puntuaciones en el ACP del año 2014.

el fermentador al 32% de su volumen de trabajo, se completó hasta el 100% en modo discontinuo y se inició el modo continuo con perfusión.

Las muestras M125 y M126 indicaron el comienzo de la operación en modo continuo con perfusión por el filtro rotatorio 1, luego de haber sido detenida la perfusión para la realización de una purga profunda y haberse arrancado la operación en discontinuo para realizar la limpieza de la bomba de la corriente de recirculación, hasta arrancar la perfusión.

En el gráfico de los pesos de correlación (Fig. 4) se puede observar la influencia de cada variable en la formación de cada componente y además las correlaciones existentes entre las variables a partir de los agrupamientos que se forman entre estas.

Se observa que todas las variables aportan variabilidad significativa al proceso al estar ubicadas entre las dos elipses.

Sobre el primer componente todas tienen alto peso, y respecto al segundo componente las más influyentes son el tiempo de duración del cultivo (t) y el flujo de medio de cultivo (F).

Las variables T, pH, rpm, DO y Viab están altamente correlacionadas entre sí, debido a que son parámetros de operación del proceso que tienen gran influencia en el desarrollo celular y la formación de producto, por lo que deben ser estrictamente controladas.

Mediante los pesos de cada variable sobre cada componente se pueden obtener los modelos correspondientes:

Para el CP1:

$$CP_1 = 0,659Viab + 0,494t + 0,378rpm + 0,336DO + 0,253T + 4,845 \times 10^{-2} pH + 1,661 \times 10^{-3} F + 1,089 \times 10^{-4} V_c + 3,792 \times 10^{-8} q_p$$

Para el CP2:

$$CP_2 = 0,864t + 3,366 \times 10^{-3} F - 1,393 \times 10^{-7} q_p - 1,245 \times 10^{-4} V_c - 2,637 \times 10^{-2} pH - 0,104DO - 0,134T - 0,176rpm - 0,439Viab$$

De las variables que más aportan a la variabilidad del proceso, solo constituyen controles de proceso la viabilidad celular, concentración de células vivas y equilibrio ácido-base (pH), mientras que el resto se clasifican como parámetros de operación. A partir de los resultados obtenidos en el ACP se concluye que deben incluirse en la estrategia de control de proceso las siguientes variables: temperatura, velocidad de agitación, oxígeno disuelto y tiempo de duración del cultivo.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten desarrollar un proceso más eficiente, con un control más estricto dirigido a las variables que más variabilidad aportan al proceso y a los atributos críticos de calidad del producto de la etapa de fermentación, lo que enriquece el proceso de validación y la Verificación Continuada del Proceso.

Esto permite aumentar la capacidad productiva de esta etapa al tener un mayor aprovechamiento del tiempo productivo y una disminución de los costos asociados a la etapa de fermentación, pues al tener un mayor control, conocimiento y entendimiento del proceso no

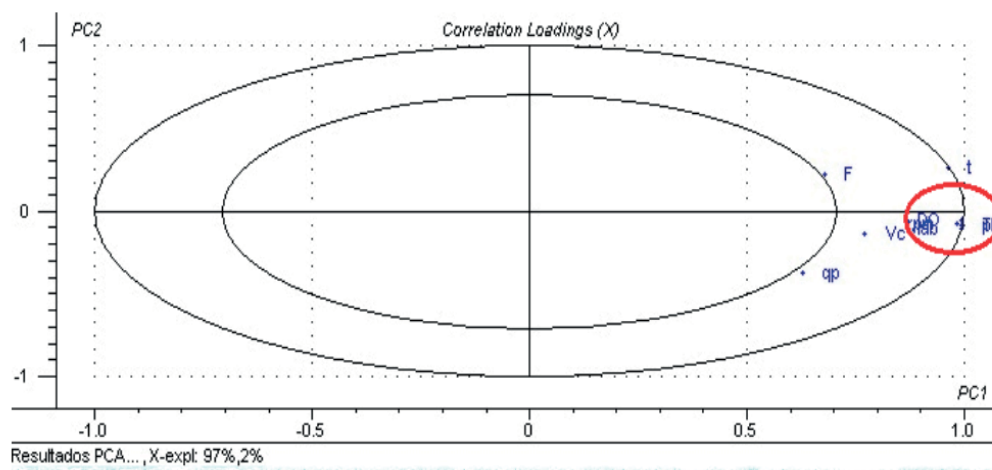


Fig. 4. Gráfico de los pesos de correlación en el ACP del año 2014.

se tendrá que incurrir en un gasto mayor de materiales de producción o interrumpir las corridas por tener baja viabilidad celular, poca expresión del producto de interés o por contaminación microbiana.

Conclusiones

La aplicación del Análisis de Componentes Principales a los datos registrados, durante la campaña realizada en el año 2014, de los parámetros críticos del proceso de fermentación industrial del anticuerpo monoclonal analizado, permitió reducir la dimensionalidad de los datos y explicar las principales fuentes de variabilidad del proceso.

Como resultado se obtuvo que dos componentes principales logran explicar más del 99% de la varianza total, y se logró definir cuáles son los parámetros críticos que mayor aporte tienen a la variabilidad del proceso de fermentación. Dichos resultados corroboraron experiencias prácticas de especialistas de la planta y permitieron dar recomendaciones a considerar en el Plan de Verificación Continuada del Proceso, como proponer la inclusión en la estrategia de control del proceso a la temperatura, la velocidad de agitación, el oxígeno disuelto y el tiempo de duración del cultivo.

Referencias

- Mitchell M. Determining Criticality-Process Parameters and Quality Attributes Part I: Criticality as a Continuum. *BioPharm International* 2013;26(12). Disponible en: <http://www.biopharminternational.com/determining-criticality-process-parameters-and-quality-attributes-part-i-criticality-continuum>.
- Long M, Baseman H, Henkels, W D. FDA's New Process Validation Guidance: Industry Reaction, Questions, and Challenges. *Pharmaceutical Technology* 2011;2011(5). Disponible en: <http://www.pharmtech.com/fdas-new-process-validation-guidance-industry-reaction-questions-and-challenges?id=&pageID=1&sk=&date=>.
- Crombet T, Osorio M, Cruz T, Roca C, del Csatillo R, Mon R, et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22(9): 1646-54.
- Swarbrick B. *Multivariate data analysis for Dummies*. CAMO Software Special Edition. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2012. Disponible en: <http://downloads.deusm.com/pharmaevolution/CAMO-Multivariate-Data-Analysis.pdf>.
- Singh SK, Rathore AS. Use of multivariate data analysis in bioprocessing. *BioPharm International* 2015;28(6): Disponible en: <http://www.biopharminternational.com/use-multivariate-data-analysis-bioprocessing>.
- Ferrer-Riquelme AJ. Control estadístico megavariante para los procesos del siglo XXI. En: Universitat de Lleida, editores. 27 Congreso Nacional de Estadística e Investigación Operativa: Lleida, 8 al 11 de abril de 2003. Lleida, Cataluña, España: Universitat de Lleida; 2003: 24-38.
- CAMO Software. *Multivariate data analysis for biotechnology and bio-processing* [monografía en Internet]. Oslo: CAMO Software AS; 2012. Disponible en: <http://www.camo.com/resources/useful-guides/mva-biotech.html>.
- CAMO Software. *What is multivariate analysis?* [monografía en Internet]. Oslo: CAMO Software AS; 2011. Disponible en: www.smitconsult.nl/assets/Uploads/white-paper-MVA.pdf.
- Hernández C, Rodríguez J. Preprocesamiento de datos estructurados. *Vínculos*. 2008; 4(2):27-48. Disponible en: <https://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/vinculos/article/view/4123/5790>.

Application of Principal Components Analysis in the fermentation process of a monoclonal antibody

Abstract

In the Center of Molecular Immunology (Havana, Cuba) an effective therapeutic monoclonal antibody against head and neck cancer is produced. Given the great variability of the concentration of this antibody in the industrial fermentation stage of the plant, it became necessary to apply a multivariate analysis technique such as the Principal Component Analysis, in order to reduce data dimensionality and to explain the main sources of variability of the process. In order to carry out the Principal Component Analysis through the software *THE UNSCRAMBLER*, the determination of the critical parameters of the fermentation stage through a risk model based on input and output matrix using data from the campaign of the year 2014 was carried out. As a result, two main components were able to explain more than 99% of the total variance, and it was possible to define the critical parameters that have the greatest contribution to the variability of the fermentation process. These results corroborated the practical experiences of specialists of the plant and allowed to give recommendations to consider in the Plan of Continuous Verification of the Process as proposing the inclusion in the strategy of control of the process the variables temperature, the speed of agitation, dissolved oxygen and the culture duration.

Keywords: monoclonal antibody, fermentation, Principal Component Analysis, critical process parameter.

Recibido: Diciembre de 2017

Aceptado: Febrero de 2018