

# Capacidad de procesamiento de los nanofiltros empleados en la purificación de la proteína recombinante del dominio de unión al receptor del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo

Ivis Regalado-Fonseca<sup>1,2\*</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7989-8225>

Lourdes Hernández-de la Rosa<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4041-0445>

Martha R. Castro-Figueroa<sup>2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4016-4120>

Lourdes M. Zumalacárregui-de Cárdenas<sup>2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6921-737X>

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría". La Habana, Cuba.

**Autor para correspondencia:** [ivisr@cim.sld.cu](mailto:ivisr@cim.sld.cu)

En el Centro de Inmunología Molecular se producen el ingrediente farmacéutico activo y la materia prima biológica empleados para la formulación de las vacunas SOBERANAS<sup>®</sup>. El antígeno de estas vacunas es la proteína del dominio de unión al receptor del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo. La producción de esta proteína recombinante se basa en el cultivo de células de ovario de hámster chino en biorreactores tipo tanque agitado. El proceso tecnológico a escala industrial consta de varias etapas: preparación de medios de cultivo y soluciones, fermentación, clarificación de sobrenadante y purificación. En los procesos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen animal, la contaminación viral endógena o adventicia constituye un riesgo potencial. Por tal motivo, en el proceso de purificación se emplea un paso específico para la remoción viral mediante la nanofiltración. Los nanofiltros empleados son materiales desechables que influyen significativamente en el costo del proceso. Actualmente se desconoce la capacidad de procesamiento de los nanofiltros en el proceso de purificación en cuestión, siendo el objetivo de la presente investigación con vistas a reducir los costos de producción. Se determinó la capacidad de procesamiento de los filtros *Virosart* CPV, siendo de 239,74 g/m<sup>2</sup> (71,67% de saturación) y 1.259 g/m<sup>2</sup> (67,82% de saturación) para la especie dímero y la mezcla, respectivamente. Se determinó la disminución del costo de producción de la etapa de nanofiltración, que representa una disminución del 54,85% del costo de filtración de la especie dímero y un 25% de la mezcla.

**Palabras clave:** filtros; filtración por membranas; nanoporos; vacunas.

## Introducción

En los procesos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen animal, la contaminación viral es un riesgo. Para garantizar la máxima seguridad, la directriz reguladora de la Conferencia Internacional sobre Armonización recomienda implementar tecnologías que remuevan virus en los procesos de fabricación de productos para uso en humanos; de ahí la importancia de demostrar la capacidad para eliminar o inactivar este tipo de contaminantes en los procesos biotecnológicos,<sup>(1)</sup> y garantizar la salud de los pacientes, una vez el producto se encuentre disponible en el mercado.<sup>(2)</sup>

Los virus presentes en los procesos biotecnológicos se dividen en tres categorías: adventicios, endógenos y no endógenos. Los virus adventicios son introducidos durante el proceso de fabricación mediante materias primas contaminadas o por malas prácticas de producción, mientras que los virus endógenos se originan por la línea celular empleada para expresar el producto. Los virus no endógenos provienen de fuentes externas presentes en el banco maestro de células.<sup>(1)</sup>

Los retrovirus murinos son una preocupación clave en las células de ovario de hámster chino (CHO). A menudo se emplea para estudios de eliminación viral, el

\* Ingeniera Química, Especialista III en Investigación, Innovación y Desarrollo. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba. Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría". La Habana, Cuba.

virus xenotrópico de leucemia murina (X-MuLV).<sup>(1)</sup> A pesar de que en los procesos biotecnológicos que se emplean células CHO, no se ha reportado la presencia del virus diminuto de ratón (MVM), este es un contaminante potencial debido a su pequeño tamaño, por lo que es difícil eliminar en los procesos de nanofiltración. El MVM se emplea para realizar los estudios de retos virales con el objetivo de demostrar la robustez del proceso. Barone y colaboradores, reportaron una contaminación con el MVM, en este caso el proceso no contenía materias primas derivadas de animales.<sup>(3)</sup> Este virus puede no ser detectable, incluso con un control establecido de roedores, y persistir en el medio ambiente y en las materias primas mucho tiempo después de su vertimiento.<sup>(3)</sup>

La filtración de virus se considera una de las herramientas de eliminación de virus más eficaces, robustas y ampliamente aplicables, debido a que elimina los contaminantes virales en función de un mecanismo de exclusión por tamaño.<sup>(4)</sup> En la filtración de virus, en los procesos de purificación de proteínas, las pequeñas cantidades de agregados, principalmente en el intervalo de tamaño de 16-30 nm, son uno de los principales contaminantes.<sup>(5)</sup> El rendimiento del filtro depende en gran medida de las condiciones de operación (presión transmembrana y flujo).<sup>(6)</sup> La presencia de agregados en la solución proteica puede disminuir la capacidad de procesamiento del filtro; para reducir el impacto de estas variaciones y proteger el filtro empleado para la eliminación de partículas virales, es recomendado el uso de prefiltros.<sup>(5)</sup>

Estos filtros se aplican en procesos biotecnológicos de separación, en los campos médico y farmacéutico, remoción de sales, entre otros.<sup>(7)</sup> Generalmente esta operación no requiere de la adición de productos químicos agresivos, se puede realizar a temperatura ambiente, los filtros poseen una membrana polimérica que retiene los contaminantes presentes en el producto y el proceso es eficiente. Las propiedades de una membrana polimérica dependen principalmente de dos factores: la naturaleza físico-química del polímero y el método de síntesis de la misma.<sup>(7)</sup> En los últimos años, muchos de los polímeros cargados positivamente (catiónicos) han demostrado propiedades antivirales y que son muy adecuados para la funcionalización de membranas poliméricas.<sup>(8)</sup>

Diversos autores han realizado estudios sobre la capacidad de procesamiento de filtros empleados para la eliminación de partículas virales en la industria biotecnológica. En el proceso de purificación del anticuerpo monoclonal Nimotuzumab, que posee una masa molar de 150 kg/mol, la capacidad másica de procesamiento de los filtros *Virosart* CPV es de 995 g/m<sup>2</sup>;<sup>(9)</sup> mientras que para el anticuerpo monoclonal Racotumomab, que posee igual masa molar, se obtuvo una capacidad de procesamiento de 1.142 g/m<sup>2</sup>.<sup>(10)</sup>

También se obtuvo una capacidad de procesamiento de los filtros *Virosart* CPV de 138,53 g/m<sup>2</sup> para la eritropoyetina humana recombinante, la cual posee una masa molar de 34 kg/mol.<sup>(11)</sup> Además, Alsop y colaboradores, reportan una capacidad de procesamiento de los filtros *Virosart* MAX-HF (membrana de fibra hueca) de 1.350 g/m<sup>2</sup> para un anticuerpo monoclonal con masa molar de 200 kg/mol y presencia de agregados inferior al 5%.<sup>(12)</sup> Bolton y colaboradores, reportan para los filtros *Virosart* CPV, una capacidad másica de procesamiento de 26.400 g/m<sup>2</sup> para un anticuerpo monoclonal de 0,15 kg/mol,<sup>(13)</sup> siendo superior la capacidad de procesamiento para este último, debido a que posee menor tamaño molecular. También se emplean otros tipos de filtros para la eliminación de partículas virales.

Los filtros *Virosart* CPV se emplean en la purificación de anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos o pequeñas proteínas recombinantes (<150 kg/mol)<sup>(14)</sup> para asegurar que el producto final no posea contaminación viral; se utilizan al final del proceso de purificación para la filtración de virus en productos biofarmacéuticos, donde la pureza del producto es la más alta y el bloqueo del filtro empleado para la eliminación de virus, debido a contaminantes (ADN, agregados y lipoproteínas), es más bajo que en la etapa de purificación intermedia,<sup>(15,16)</sup> ya que pequeñas cantidades pueden ser suficientes para causar un bloqueo prematuro de dicho filtro.<sup>(15)</sup> La capacidad de retener más de 4 log de los virus pequeños sin envoltura no se correlaciona necesariamente con la disminución del flujo.<sup>(17)</sup> Estos filtros ofrecen la mayor seguridad viral en todo el perfil de disminución de flujo hasta el 90%,<sup>(14,15)</sup> por lo que son empleados en el proceso de

purificación del anticuerpo monoclonal Nimotuzumab<sup>(9)</sup> y de la proteína del dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo, la cual presenta una cola de histidina.

Los anticuerpos anti-RBD presentan una alta calidad y funcionalidad, lo cual respalda el hecho de que la proteína recombinante RBD sea considerada como antígeno vacunal. El uso de RBD monomérica como antígeno ha inducido buena respuesta de anticuerpos en varios modelos animales, sin embargo, el diseño de RBD dimérico produce títulos de anticuerpos de 10 a 100 veces más altos.<sup>(18)</sup> La tecnología de vacuna conjugada ha logrado una sólida respuesta neutralizante. Múltiples copias del antígeno RBD se unen químicamente a una proteína portadora inmunogénica, la que permite una respuesta de anticuerpos potenciada.

El 11 de marzo de 2020 se detectaron los primeros casos de COVID-19 en Cuba.<sup>(19)</sup> Con el incremento del número de personas infectadas, los científicos cubanos empezaron a realizar investigaciones con el objetivo de obtener una vacuna para enfrentar esta enfermedad. El Centro de Inmunología Molecular (CIM) se dedicó a la producción del ingrediente farmacéutico activo y la materia prima biológica empleados para la formulación de las vacunas SOBERANAS<sup>®</sup>.

En diciembre del año 2020, comenzó en la planta de producción Antyter, la producción de la proteína RBD (aa319-541), la cual presenta una cola de histidina; para ello se adecuaron las condiciones para emplear el equipamiento existente en la planta teniendo en cuenta las exigencias regulatorias.<sup>(1)</sup> El proceso de purificación de la proteína RBD (aa319-541) comienza con la filtración del sobrenadante proveniente de fermentación, cuyo objetivo es eliminar células, agregados y restos celulares presentes. Luego se realiza un paso de captura para aislar, concentrar y estabilizar el producto de interés, con el cual también se puede lograr la remoción de los contaminantes críticos. Seguidamente se efectúa una cromatografía de exclusión molecular, con el objetivo de preparar las condiciones para la cromatografía de intercambio catiónico, en la cual se eliminan los contaminantes (tales como endotoxinas, ADN y agregados de la proteína) presentes en el producto.<sup>(20)</sup> A continuación, se realiza otra

cromatografía de exclusión molecular (se emplea la matriz cromatográfica Superdex 200 pre grade) como paso de purificación final de la proteína<sup>(21)</sup> y se separan los dos productos de interés (el dímero y la mezcla de monómero y dímero). Luego se ejecuta la nanofiltración para eliminar las partículas virales que puedan estar presentes, empleando un filtro de 20 nm de diámetro de corte. Al producto obtenido en el paso anterior se le añade una solución ajustadora para estabilizar la proteína para su posterior almacenamiento y se microfiltra con el empleo de un filtro de 0,2 µm hacia una bolsa estéril y apirogénica.<sup>(20)</sup> De acuerdo con las exigencias regulatorias,<sup>(1)</sup> el paso de nanofiltración se estableció para demostrar la no existencia de partículas virales en el producto. Sin embargo, al ser un producto nuevo, se desconocía la capacidad de procesamiento de los filtros utilizados para la eliminación de partículas virales en el proceso de purificación; información necesaria para su mejor explotación y reducción del costo de producción. Por consiguiente, los objetivos de este trabajo fueron determinar la capacidad de procesamiento de los filtros empleados para la eliminación de virus en el proceso de purificación de las vacunas SOBERANAS<sup>®</sup> y disminuir el costo de producción de la etapa de filtración.

## Materiales y Métodos

### Procesamiento de la información histórica

Se analizaron nueve parámetros de calidad, con 27 registros de cada uno (muestras). Se empleó la estadística descriptiva básica: media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación (CV), mínimo, máximo, y sesgo y curtosis estandarizados. Se empleó el software *Statgraphics Centurion XVII* versión 17.2.00.

### Determinación de la capacidad de procesamiento de los filtros empleados para la eliminación de virus a escala de laboratorio

Para el enjuague inicial, se añadió en el reservorio 20 mL de la solución tampón de Superdex (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,4 y conductividad de 12-18 mS/cm), se presurizó a 200 kPa (presión de trabajo) y se filtró la solución durante 15 min, para esto se empleó un tanque de nitrógeno, un manómetro digital

(0 - 4000 psi, USG, Estados Unidos) y un regulador de presión (IR2010-F02, SMC, Japón). Luego se despresurizó el sistema, se añadió el producto al reservorio (dímero o mezcla de monómero y dímero de la proteína RBD), se volvió a presurizar y se filtró el producto a presión constante hasta que se agotó.<sup>(10)</sup> Se emplearon los filtros *Virosart Minisart CPV*.

La capacidad volumétrica se determinó mediante dos métodos: a partir del cálculo del flux y calculando  $V_{m\acute{a}x}$ , empleando la ecuación 1. El flux se determinó con los datos de volumen filtrado recogidos cada un minuto, durante la filtración, mediante la ecuación 2. Para la cuantificación del volumen filtrado se empleó la balanza técnica (Extend, Sartorius Stedim Biotech, Alemania).

$$\frac{t}{V} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} t + \frac{1}{Q_0} \quad \text{ecuación (1)}$$

$$\text{flux} = \frac{V}{t \cdot A} \quad \text{ecuación (2)}$$

Donde:

V: volumen de producto filtrado

t: tiempo

A: área de filtración

$V_{m\acute{a}x}$ : volumen máximo a procesar por filtro

$Q_0$ : flujo volumétrico inicial

En el método a partir del cálculo del flux se realizaron dos gráficos: t vs flux y flux vs % saturación, para la determinación del volumen máximo a procesar por el filtro y el comportamiento de la saturación en el filtro.

En el método de determinación de  $V_{m\acute{a}x}$  se elaboró un gráfico de tiempo/volumen en función del tiempo (t/v vs t). Por recomendación de la literatura, se desprecian los primeros 5 min de experimentación.<sup>(22,23)</sup> El ajuste de los datos al modelo a una línea recta permitió determinar  $V_{m\acute{a}x}$  del inverso de la pendiente.

### Determinación del porcentaje de saturación

El porcentaje de saturación se determinó mediante la ecuación 3.<sup>(10)</sup>

$$\% \text{ saturación} = \frac{Q_f}{Q_i} \cdot 100 \quad \text{ecuación (3)}$$

Donde:

% saturación: porcentaje de saturación

$Q_i$ : flujo volumétrico inicial

$Q_f$ : flujo volumétrico final

### Determinación de la capacidad másica de procesamiento

La capacidad másica de procesamiento de los filtros empleados para la eliminación de partículas virales se determinó con la ecuación 4.

$$C_p = \frac{V_f \cdot C_p}{A_0} \quad \text{ecuación (4)}$$

Donde:

$C_p$ : capacidad de procesamiento

$V_f$ : volumen total filtrado

$C_p$ : concentración de proteínas

$A_0$ : área del filtro de prueba

### Determinación del recobrado

El recobrado es un parámetro de desempeño de cada etapa de un proceso de purificación de proteínas.<sup>(10)</sup> Se determinó mediante la ecuación 5. La masa de proteína obtenida en el paso de filtración para la eliminación de virus se obtuvo mediante la técnica de espectrofotometría, en la cual se midió la densidad óptica a 280 nm con el empleo de un espectrofotómetro UV-VIS (Génesis 10S, Thermo Scientific, Estados Unidos).

$$R = \frac{m_{salida}}{m_{entrada}} \cdot 100 \quad \text{ecuación (5)}$$

Donde:

R: recobrado (%)

$m_{salida}$ : masa de proteína al finalizar el paso de filtración para la eliminación de virus

$m_{entrada}$ : masa de proteína al iniciar el paso de filtración para la eliminación de virus

### Determinación de la capacidad de procesamiento de los filtros empleados para la eliminación de partículas virales a escala de producción

Con la capacidad másica de procesamiento de los filtros obtenida a partir del flux, se calculó la masa máxima

que se puede procesar a escala de producción, debido a que la concentración del producto de entrada al proceso de filtración es variable. El filtro empleado en el proceso productivo tiene un área de 0,70 m<sup>2</sup>.

### Determinación del costo de producción

Se realizó una comparación entre el costo de producción para la etapa de filtración del proceso de producción actual y del que surge con la implementación de las nuevas condiciones. Con las nuevas condiciones, se procesan con un filtro ocho lotes de dímero, y de igual forma, con un filtro se procesan ocho lotes de mezcla.

### Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los estadígrafos determinados para cada variable analizada en los pasos de exclusión molecular y filtración para la eliminación de virus.

Se analizaron los lotes de mezcla y dímero producidos en los años 2021 y 2022. Las variables que presentaron valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada fuera del intervalo entre -2 y 2, poseen desviación significativa de la normalidad, en este caso son: masa de

la especie dimérica en el paso de Superdex (mdim), pureza de la especie dimérica en el paso de Superdex (pdim), masa de la mezcla en el paso de Superdex (mmez), porcentaje de la especie monómero obtenida en la mezcla en el paso de Superdex (mmez) y porcentaje de la especie dímero en la mezcla obtenida en el paso de Superdex (pdmez). Las variables masa de la especie dimérica en el paso de Superdex (mdim) y porcentaje de la especie dímero presente en la mezcla (pdmez) poseían coeficiente de variación superior al 40%, por lo que presentan una gran variabilidad. Los coeficientes de variación se consideran bajos cuando son inferiores al 10% y muy altos cuando son superiores al 40%.<sup>(24)</sup> La variación de la masa de proteína es común en operaciones donde predomina un elevado componente manual (cada turno de trabajo tiene un estilo de operación propio) y donde existe una variabilidad en la expresión de la proteína de interés durante el cultivo celular en modo de perfusión.<sup>(25)</sup> Al inicio de la etapa de fermentación hay poca cantidad de células y, por tanto, la concentración del producto es baja. Con la adición de nutrientes al fermentador y el ajuste de las condiciones del cultivo se logra que la cantidad de células vaya

**Tabla 1.** Indicadores estadísticos de las variables de los pasos de exclusión molecular (Superdex) y filtración para la eliminación de virus.

VARIABLES	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Sesgo estandarizado	Curtosis estandarizada	Desviación estándar	CV (%)
cdim	0,69	1,86	1,23	1,13	0,86	-1,13	0,36	29,05
mdim	6,32	30,34	12,52	10,06	3,62	2,52	6,28	50,14
rdim	77,83	100	93,80	93,87	-1,82	1,49	0,05	5,69
pdim	62,31	100	97,03	98,11	-10,41	26,38	0,07	7,28
cmezfv	0,89	2,64	1,62	1,61	1,24	0,88	0,38	23,37
mmez	14,54	65,92	31,77	28,67	2,82	2,58	11,13	35,04
rmezfv	80,67	100	93,55	92,53	-1,65	-0,06	0,06	6,56
pmmez	73,53	97,68	90,82	91,79	-4,97	8,82	0,04	4,90
pdmez	2,32	26,47	9,00	8,15	5,05	8,81	0,05	49,91

cdim: concentración de la especie dimérica en el paso Superdex; mdim: masa de la especie dimérica en el paso Superdex; rdim: recobrado de la especie dimérica en el paso filtración para la eliminación de virus; pdim: pureza de la especie dimérica en el paso Superdex; cmezfv: concentración de la mezcla en el paso filtración para la eliminación de virus; mmez: masa de la mezcla en el paso Superdex; rmezfv: recobrado de la mezcla en el paso filtración para la eliminación de virus; pmmez: porcentaje de la especie monomérica presente en la mezcla en el paso Superdex; pdmez: porcentaje de la especie dimérica presente en la mezcla en el paso Superdex. CV: coeficiente de variación.

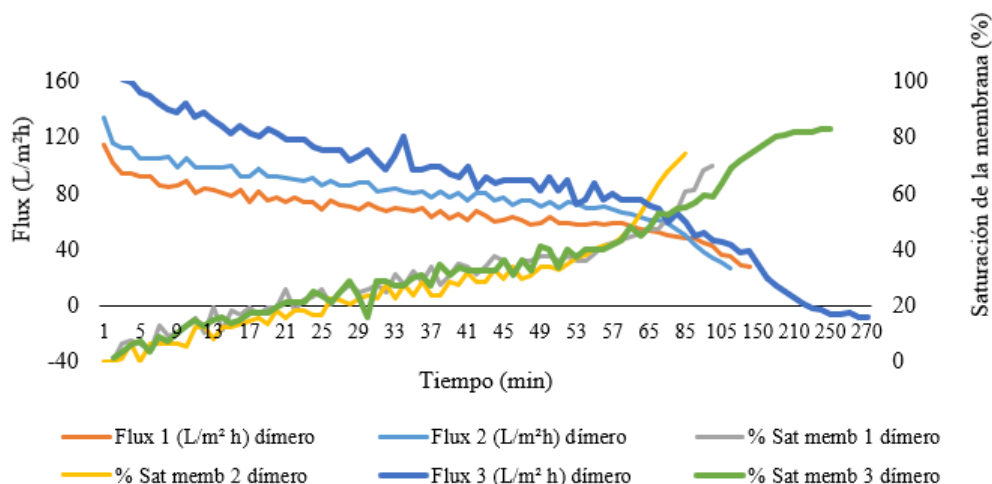
aumentando por día hasta que se alcanza la máxima concentración de células de manera estable en el fermentador. En esta condición se obtiene una mayor concentración de producto con respecto al inicio de la fermentación.<sup>(25)</sup> Existe variabilidad en el porcentaje de la especie dimérica presente en la mezcla, por lo que el proceso de separación del dímero y la mezcla se debe continuar perfeccionando, siendo esta una oportunidad de mejora en el proceso de purificación de la proteína RBD (aa319-541). También es necesario que el personal reciba, con frecuencia, una capacitación para disminuir las desviaciones en el proceso, que puedan estar asociadas al personal.

### Determinación de la capacidad de procesamiento del filtro empleado para la eliminación de partículas virales presentes en la especie dimérica y la mezcla

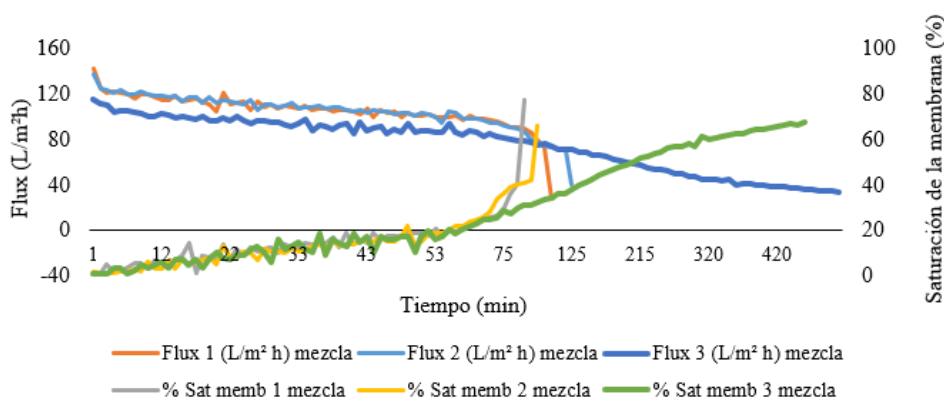
En las Figuras 1 y 2 se muestran la evolución del flux y el porcentaje de saturación del filtro durante la filtración de la especie dimérica y de la mezcla de la proteína RBD (aa319-541), respectivamente, empleando el filtro *Virosart Minisart* CPV. Se observó que los perfiles de flux y saturación de la membrana (%), de las corridas 1 y 2 de la mezcla, son similares.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las corridas 1 y 2 de la especie dímero y de la mezcla. Las corridas experimentales de la especie dímero se realizaron con el mismo lote de producto obtenido en el paso de

exclusión molecular (Superdex), con concentración (1,73 mg/mL) y pureza (dímero: 62,31 % y monómero: 37,67 %). El volumen de filtrado fue levemente superior en la corrida 2 y la operación de filtración se realizó en un menor tiempo. Este resultado puede estar asociado a la variabilidad entre filtros, lo cual no afectó su desempeño, pues se logró saturar el mismo hasta el 70% de su capacidad; otros autores demostraron que estos filtros ofrecen una gran seguridad viral en todo el perfil de disminución de flujo hasta el 90%.<sup>(15,16)</sup> Los filtros *Virosart Minisart* CPV poseen un tamaño de poro uniforme de 20 nm aproximadamente<sup>(16)</sup> y una pequeña variación en la uniformidad del tamaño de poros puede provocar cambios en la capacidad de procesamiento del filtro. La capacidad de procesamiento promedio de RBD (posee una cola de histidina) hasta el 70% de saturación de la membrana fue 389 g/m<sup>2</sup>. Teniendo en cuenta que el área del filtro en la escala de producción es 0,70 m<sup>2</sup>, se puede filtrar un promedio de 272,39 g de la especie dímero por cada filtro. Los gramos que se filtran por unidad de área de filtración no son una especificación establecida para cada filtro. Este parámetro depende de diversos factores como son el tamaño del producto, la concentración del producto, la concentración de sales, la pureza (presencia de agregados, contaminantes),<sup>(5)</sup> por ello se estudia para cada producto, siendo el objetivo de esta investigación.



**Fig. 1.** Evolución del flux y porcentaje de saturación (%) durante la filtración para la eliminación de partículas virales en la especie dimérica de la proteína RBD (aa319-541) que posee una cola de histidina.



**Fig. 2.** Evolución del flux y porcentaje de saturación (%) durante la filtración para la eliminación de partículas virales en la mezcla de la proteína RBD (aa319-541) que posee una cola de histidina.

**Tabla 2.** Resultados de la filtración para la eliminación de virus de las corridas 1 y 2 de la especie dimerica y la mezcla.

	Dímero					Mezcla				
	Corrida 1	Corrida 2	Prom	DE	CV (%)	Corrida 1	Corrida 2	Prom	DE	CV (%)
Volumen total filtrado (mL)	104,11	120,82	112,46	10,82	10,51	143,25	146,86	145,20	2,55	1,76
Tiempo total (min)	270,00	260,00	265	7,07	2,67	205,00	194,00	199,50	7,78	3,90
Flujo inicial (mL/min)	0,77	0,88	0,83	0,08	9,43	1,02	1,01	1,015	0,01	0,70
Flujo final (mL/min)	0,24	0,26	0,25	0,01	5,66	0,24	0,34	0,29	0,07	24,38
Saturación de la membrana (%)	69,74	70,91	69,95	0,83	1,18	77,00	66,08	71,54	7,72	10,79
Capacidad de procesamiento (g/m <sup>2</sup> )	360,22	418,04	389,13	40,89	10,51	595,90	610,90	603,40	10,61	1,76
Masa de proteína a aplicar por filtro (g)	252,15	292,63	272,39	28,62	10,51	417,14	427,66	422,40	7,44	1,76

Prom: promedio. DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Las corridas experimentales de mezcla también se realizaron con el mismo lote de producto obtenido en el paso de exclusión molecular (Superdex), con concentración (2,08 mg/mL) y pureza (dímero: 2,32 % y monómero 97,68 %). El volumen de filtrado y el tiempo de la operación de filtración fue similar en ambas corridas. La capacidad de procesamiento promedio fue 603,40 g/m<sup>2</sup> (71,54 % de saturación), teniendo en cuenta que el área del filtro en la escala de

producción es 0,70 m<sup>2</sup> se pueden filtrar 422,40 g de mezcla por cada filtro como promedio.

Luego de realizadas las dos corridas experimentales de la especie dímero, se realizó una tercera y se empleó otro lote de producto, con concentración (1,56 mg/mL) y pureza (dímero: 96,99% y monómero: 2,92%), siendo los valores de pureza diferentes. Los valores de concentración de las tres corridas son elevados en comparación con los valores de mínimo (0,69 mg/mL) y

media (1,23 mg/mL) obtenidos en este proceso; se realizó la investigación con valores cercanos al máximo (1,86 mg/mL). Se pudo saturar el filtro hasta el 90%, solamente en la última corrida, debido a la poca disponibilidad de producto. Se apreció que en las corridas 1 y 2, a partir del 40% de saturación, cambió el patrón de comportamiento de la curva (punto de inflexión) y comenzó a saturarse más rápido el filtro (Fig. 1). Mientras que, en la última corrida se aprecia una curva con tendencia al aumento, prácticamente de forma lineal, lo cual puede estar asociado a la diferencia de pureza entre los lotes empleados.<sup>(5)</sup> En la última corrida el porcentaje de la especie dímeros es superior, esta molécula es de mayor tamaño que el monómero, por lo que se esperaba que la saturación del filtro se alcanzara más rápido, como sucedió, pues influye la pureza del producto en la saturación del mismo.<sup>(5)</sup> Otros factores que afectan la saturación del filtro son la concentración de proteína y de sales.<sup>(5)</sup> Se obtuvo el 71,67% de saturación a los 180 min, mientras que en las corridas 1 y 2 los valores alcanzados fueron 69,74% y 74,32%, a los 270 min.

Al igual que en el caso de la especie dímero, luego de haber realizado las dos corridas experimentales de la mezcla, se realizó una tercera, en la cual se empleó otro lote de producto con concentración (2,64 mg/mL) y pureza (monómero: 91,53% y dímero: 8,48%), siendo los valores de pureza diferentes. Se obtuvo que cuando se trabajó con la concentración cercana a las máximas obtenidas en el proceso (2,64 mg/mL), menores fueron los valores de disminución de flujo inicial y se demoró más en alcanzar valores próximos al 70% de saturación

del filtro. Se alcanzó el 67,82 % de saturación del filtro, no fue posible llegar hasta el 90% por la poca disponibilidad de producto, como se mencionó anteriormente. Se apreció que en las corridas 1 y 2, a partir del 26% de saturación, cambió el patrón de comportamiento de la curva (punto de inflexión) y comenzó a saturarse más rápido el filtro (Fig. 1). Mientras que, en la última corrida se apreció una curva con tendencia al aumento, prácticamente de forma lineal, lo cual puede estar asociado a las diferencias de pureza y concentración entre los lotes empleados; se apreció un comportamiento similar al obtenido en la filtración de la especie dimérica.

En la última corrida de la mezcla, el porcentaje de monómeros es inferior. Esta molécula posee menor tamaño que la especie dímero, por lo que se esperaba que alcanzara más rápido el 70% de saturación del filtro, pero en este caso no ocurrió. El lote empleado poseía una mayor concentración (2,64 mg/mL) que el lote de las corridas 1 y 2 (2,08 mg/mL), por lo que la relación altas concentraciones y menores valores de pureza de la especie monómero pudiera influir en el aumento del porcentaje de saturación. Se obtuvo el 67,82% de saturación a los 500 min, mientras que en las corridas 1 y 2 se obtuvieron 77,00% y 66,08%, a los 205 min y 194 min, respectivamente.

En la Tabla 3 se reportan los parámetros de los modelos matemáticos de las tres corridas experimentales de la especie dímero y de la mezcla, obtenidos al graficar  $t/v$  vs  $t$ , donde el inverso de la pendiente corresponde a  $V_{\text{máx}}$ . En la corrida 3 se obtuvo, por este método, que el filtro empleado a escala de laboratorio puede procesar

**Tabla 3.** Parámetros de los modelos matemáticos de las tres corridas experimentales del dímero y de la mezcla.

Parámetros	Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
	Dímero	Mezcla	Dímero	Mezcla	Dímero	Mezcla
Intercepto	1,2777	0,9531	1,0741	0,9557	1,1786	1,1265
Pendiente	0,0054	0,0023	0,0044	0,0019	0,0065	0,0020
Coefficiente de correlación ajustado (%)	95,18	94,56	97,27	97,37	99,87	99,60
Error estándar	0,063	0,0205	0,043	0,015	0,031	0,021
Error medio absoluto	0,047	0,012	0,031	0,010	0,019	0,016
Estadígrafo de Durbin-Watson (DW)	0,051 (P=0,00)	0,308 (P=0,00)	0,056 (P=0,00)	0,139 (P=0,00)	0,069 (P=0,00)	0,025 (P=0,00)



un volumen máximo de 153,85 mL, para una masa de 240 g a escala de proceso; mientras que, en las corridas 1 y 2 se procesan 320,37 g y 393,18 g, respectivamente.

Se observa que la capacidad de procesamiento del filtro dependió de la pureza y se corresponde con los resultados obtenidos por Namilia F.<sup>(5)</sup> en la última corrida de dímero, el producto poseía mayores valores de pureza, pues el porcentaje de dímeros es de 96,99% y, en estas condiciones, el filtro es capaz de procesar una menor cantidad de masa de la proteína RBD que posee una cola de histidina, lo cual estuvo asociado al superior tamaño de la molécula dímero con respecto al monómero.

En el caso de la mezcla también se observó que la capacidad de procesamiento del filtro depende de la pureza y la concentración del producto filtrado, corroborando lo reportado por Namilia F.<sup>(5)</sup> En las corridas 1 y 2 el producto poseía mayores valores de pureza, pues el porcentaje de monómero es de 97,68% y el filtro fue capaz de procesar una menor cantidad de masa de la proteína RBD que posee una cola de histidina.

Los coeficientes de correlación ajustados de los tres modelos obtenidos (dímero y mezcla) son superiores al 95%, excepto en la corrida 1 de mezcla; pero el estadígrafo de Durbin-Watson (DW) es inferior a 1, en todos los casos y su valor P es de cero (menor que 0,05), por lo que existe una posible correlación en serie entre

los residuos al nivel de confianza del 95%. Este valor de DW implica que puede existir subestimación del nivel de significación estadística.

En la Tabla 4 se reportan los resultados de ambos métodos, tanto para la especie dímero como para la mezcla. Se eligió la capacidad de procesamiento del filtro obtenida a partir del cálculo del flux, atendiendo al resultado de la poca validez estadística del modelo lineal discutido anteriormente. En el caso de la especie dímero se escogió la capacidad de procesamiento del filtro obtenida en la corrida 3 (239,74 g/m<sup>2</sup>) para un 71,67% de saturación de la membrana, debido a que poseía mayores valores de pureza, similares a los que generalmente se obtuvieron en el proceso productivo, siendo la mediana de 98,11% de dímero. Se dejó aproximadamente un 20% de seguridad, pues no se ha realizado aún el reto viral de los filtros empleando este producto. Estos filtros también son utilizados en el proceso de purificación de Nimotuzumab y el reto viral realizado reportó que el flux se redujo en 4,33 veces con respecto a las corridas en blanco<sup>(9)</sup> y es casi cero cuando la saturación de la membrana alcanza el 90%. Se demostró que remueve más de 4 log para perfiles de saturación de la membrana hasta un 90%.<sup>(9)</sup>

En el caso de la mezcla se escogió la capacidad de procesamiento del filtro obtenida en la corrida 3 (1.259 g/m<sup>2</sup>) para un 67,82% de saturación de la membrana, debido a que poseía valores de pureza, similares a los

**Tabla 4.** Resultados de capacidad de los filtros por los métodos de  $V_{\text{máx}}$  y a partir del flux para el dímero y la mezcla.

Corrida	Capacidad (L/m <sup>2</sup> )	Capacidad (g/m <sup>2</sup> )	Saturación (%)	Métodos			
				Calculando $V_{\text{máx}}$		A partir del flux	
				$V_{\text{máx}}$ (mL)	Masa (mg)	V filt (mL)	Masa (mg)
<b>Dímero</b>							
1	208,21	360,22	69,74	185,19	320,37	104,11	252,15
2	241,64	418,04	70,91	227,27	393,18	123,08	298,10
3	209,56	326,91	90,25	153,85	240,00	104,78	228,84
<b>Mezcla</b>							
1	286,49	595,90	77,00	434,78	904,35	143,25	417,14
2	293,70	610,90	66,08	526,32	1 094,74	146,86	427,66
3	476,92	1 259,07	67,82	500,00	1 321,00	239,09	881,35

V filt: volumen filtrado.

que mayormente se obtuvieron en el proceso productivo, siendo la mediana de 91,79% de monómero en la mezcla y la concentración de RBD fue la máxima alcanzada en el proceso (2,64 g/L). Se dejó aproximadamente un 20% de seguridad, pues no se ha realizado aún el reto viral de los filtros empleando este producto, como se mencionó anteriormente.

En el proceso de purificación del anticuerpo monoclonal Nimotuzumab, la capacidad másica de procesamiento de los filtros *Virosart* CPV es de 995 g/m<sup>2</sup>,<sup>(9)</sup> siendo este valor inferior a la capacidad de procesamiento de la mezcla (1.259 g/m<sup>2</sup>). Este resultado es de esperarse debido a que el anticuerpo monoclonal posee una masa molar de 150 kg/mol, superior a la especie monomérica de la proteína RBD (31 kg/mol) y ambos productos poseen pureza por encima del 90%. Se obtuvo una capacidad de 239,74 g/m<sup>2</sup> en el dímero de la proteína RBD (62 kg/mol, este resultado es menor al obtenido para el Nimotuzumab<sup>(9)</sup> (se emplea un prefiltro) y pudiera estar ocasionado por una mayor presencia de contaminantes en el producto dímero de la proteína RBD, pues esto provoca una disminución en la capacidad de procesamiento de los filtros y, en estos casos, se recomienda el empleo de prefiltros en el proceso. Este resultado también puede estar ocasionado por el empleo de diferentes tampones en los procesos comparados. En el caso de la proteína RBD se utiliza el tampón de Superdex (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,4 y conductividad de 12-18 mS/cm), mientras que en el Nimotuzumab<sup>(9)</sup> se emplea el Tris ácido clorhídrico 20 mmol/L, pH 8 y conductividad de 0,9-1,5 mS/cm. El aumento de la concentración de sales reduce la interacción virus-membrana y provoca la disminución del flujo.<sup>(5)</sup>

Los filtros *Virosart* CPV también se han empleado en otros procesos de purificación, como es el caso del anticuerpo monoclonal Racotumomab,<sup>(10)</sup> que posee una masa molar de 150 kg/mol y para el que se obtuvo una capacidad másica de procesamiento de 1.142 g/m<sup>2</sup>, siendo este resultado cercano al obtenido para el Nimotuzumab.<sup>(9)</sup> Los resultados son semejantes debido a que ambos productos son anticuerpos monoclonales, presentan similares masas moleculares y las purezas son superiores al 90%. Sin embargo, este valor es superior al

obtenido para el dímero de la proteína RBD y ligeramente inferior a la mezcla.

La capacidad de procesamiento de la eritropoyetina humana recombinante (masa molar de 34 kg/mol) es de 138,53 g/m<sup>2</sup> al emplear los filtros *Virosart* CPV,<sup>(11)</sup> lo que resulta inferior a las capacidades obtenidas en esta investigación. La obtención de un valor de capacidad de procesamiento superior, en el caso de la RBD, pudiera estar ocasionado por una menor presencia de contaminantes y de agregados en el producto de RBD (dímero y mezcla), pues la nanofiltración se ubica al final del proceso de purificación. Sin embargo, para la eritropoyetina humana recombinante, la nanofiltración se ubica en la etapa de purificación intermedia, cuando el producto intermedio tiene mayor contenido de contaminantes.

Alsop y colaboradores, reportan una capacidad de procesamiento de los filtros *Virosart* MAX-HF (membrana de fibra hueca) de 300 L/m<sup>2</sup> (1.350 g/m<sup>2</sup>) para un anticuerpo monoclonal con masa molar de 200 kg/mol y presencia de agregados inferior al 5%.<sup>(12)</sup> Este resultado es superior al obtenido para la proteína RBD (dímero y mezcla) con el empleo de los filtros *Virosart* CPV (membrana plana), a pesar de que este anticuerpo monoclonal posee una mayor masa molar; lo cual pudiera estar ocasionado por el empleo de las membranas de fibra hueca, ya que dichas fibras tienen cierta holgura y se reduce el ensuciamiento del filtro.<sup>(14)</sup> Mientras que, Bolton y colaboradores, reportan para los filtros *Virosart* CPV, una capacidad másica de procesamiento de 26.400 g/m<sup>2</sup> para un anticuerpo monoclonal de 0,15 kg/mol,<sup>(13)</sup> siendo este valor superior a los alcanzados en la proteína RBD (dímero y mezcla) y en los anticuerpos monoclonales Nimotuzumab<sup>(9)</sup> y Racotumomab,<sup>(10)</sup> lo cual es de esperar, pues los últimos mencionados poseen una masa molar mil veces superior a dicha proteína.

### Determinación del costo de producción

En las corridas productivas analizadas se procesó una masa promedio de dímero y mezcla de 12,52 g y 31,77 g, respectivamente. Los filtros empleados en el proceso pueden procesar 13,4 veces la masa de la especie dimérica obtenida a escala industrial, mientras que en la mezcla es de 27,74 veces. Los filtros *Virosart* CPV

tienen un costo de 2.722,34 CUP. Debido al flujo de proceso solo se pueden unir ocho lotes, por lo que se pueden ahorrar en el proceso 19.056 CUP aproximadamente, tanto en el dímero (54,85 %) como en la mezcla (25%), para un ahorro total de 38.112 CUP.

### Conclusiones

La capacidad de procesamiento de los filtros *Virosart* CPV para la proteína recombinante RBD, del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo, la cual posee una cola de histidina, es de 239,74 g/m<sup>2</sup> (71,67% de saturación) para la especie dimerica y de 1.259 g/m<sup>2</sup> (67,82% de saturación) para la mezcla. El incremento de la capacidad másica a procesar en los filtros reduce el costo de producción de la etapa de nanofiltración en 38.112 CUP, lo cual representa una disminución del 54,85% del costo de nanofiltración del dímero y un 25% de la mezcla.

### Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

### Roles de autoría

Ivis Regalado-Fonseca: experimentación, procesamiento, análisis de resultados y redacción.

Lourdes Hernández-de la Rosa: conceptualización, supervisión, análisis de resultados y revisión.

Martha R. Castro-Figueroa: experimentación, procesamiento y análisis de resultados.

Lourdes M. Zumalacárregui-de Cárdenas: conceptualización, análisis de resultados y revisión.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

### Referencias

1. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A (R2). Geneva:ICH; 2022.
2. Dolan S, Manzke A, Lasse M. Impact of Pressure Release and Multiple Pressure Fluctuations on Virus Retention Performance of Virosart® HF Virus Retentive

Filters Application Note. Goettingen: Sartorius; 2016. Disponible en: <https://shop.sartorius.com/medias/Impact-of-Pressure-Release-and-Multiple-Pressure-Fluctuations-on-Virus-Retention-Performance-of-Virosart-HF-Virus-Retentive-Filters.pdf?context=bWFzdGVyfGRvY3VtZW50c3w4ODQxOTd8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGgxMC9oMGUvOTM0Mzc1OTE4Nzk5OHxjNDMwY2RhYWNiNTczMzFmZTc4ZDg0MmFiodu4Mjc3NGMwNGMxYWM2ZjdhNjQ1MDA4ODYwM2U3ZWRhNWRhODli>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).

3. Barone PW, Wiebe ME, Leung JC, Hussein ITM, Keumurian FJ, Bouressa J, et al. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies. *Nat Biotechnol.* 2020;38(5):563-72. doi: <https://10.1038/s41587-020-0507-2>.

4. Roth N, Flechsig E, Kreil T, Poelsler G, Gajardo R, Dichtelmuller H, et al. Nanofiltration as a robust method contributing to viral safety of plasma-derived therapeutics: 20 years` experience of the plasma protein manufacturers. *Tranfusion.* 2020; 60(11):2661-74. doi: <https://10.1111/trf.16022>.

5. Namilia F. The effects of solution condition on virus filtration performance. [Tesis Doctoral]. Fayetteville: University of Arkansa; 2020.

6. Davies J, Smith M. Membrane applications in monoclonal antibody production. En: Cui ZF, Muralidhara HS editor(s). *Membrane Technology.* Oxford: Butterworth-Heinemann; 2010.p.79-120.

7. Pérez-Sicairos S, Miranda-Ibarra S, Lin-Ho S, Álvarez-Sánchez J, Pérez-Reyes J, Corrales-López K, et al. Membranas de nanofiltración, preparadas vía polimerización en interfase, dopadas con nanopartículas de ZnO: efecto en su desempeño. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 2016; 15(3):961-75. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62048168025.pdf>.

8. Sinclair T, Robles D, Raza B, Rutjes S, Husman AR, Grooth J, et al. Virus reduction through microfiltration membranes modified with a cationic polymer for drinking water applications. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2018; 551: 33-41. doi: <https://10.1016/J.COLSURFA.2018.04.056>.

9. Acosta J. Estudio del aumento de capacidad de los filtros virales empleados en el proceso de purificación del Nimotuzumab. [Tesis Grado]. La Habana: Universidad de La Habana; 2020.

10. Núñez Y. Diseño de una etapa de filtración viral en el proceso de purificación de Vaxira. [Tesis Maestría]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”; 2020.
11. León Y. Diseño de una etapa de filtración viral en el proceso de producción de EPOCIM. [Tesis Grado]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría; 2016.
12. Alsop R, Dolan S, Zhuo S, Zhou W, Mak A. Virus filter optimization and transfer of biospecific antibody. Presentado en: ACS Spring 2019. Washington DC: SciMeetings; 2019. Disponible en: <https://scimeetings.acs.org/search?query=Virus+filter+optimization+&eventName=ACS+Spring+2019&sort=Recently+Added&start=1>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
13. Bolton G, Basha J, LaCasse D. Archiving high mass-throughput of therapeutic proteins through parvovirus retentive filters. *American Institute of Chemical Engineers*. 2010; 26(6):1671-7. doi: <https://10.1002/btpr.494>.
14. Sartorius. The virus filter for robust and efficient removal of all viruses Virosart CPV. Goettingen: Sartorius; 2022. Disponible en: <https://shop.sartorius.com/medias/Virosart-CPV-The-Virus-Filter-for-Robust-and-Efficient-Removal-of-All-Viruses.pdf?context=bWFzdGVyfGRvY3VtZW50c3wxNTIzMDQ1fGFwcGxpY2F0aW9uL3BkZnNoNTcvaDFILzlkzNDM3NTk2MTM5ODJ8MTc1NGUyMjBkMTU2OTQyYjExOGQ4YWE0MmZlYTk3MjFiYzdmY2E5MDM4ZDBkMGQ0OGVmOWVhODU4NjJhNjhmZg>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
15. Sartorius. Virosart® CPV Minisart®. Goettingen: Sartorius; 2022. Disponible en: <https://shop.sartorius.com/medias/Directions-for-Use-Virosart-CPV-Minisart-.pdf?context=bWFzdGVyfGRvY3VtZW50c3w0OTEwMDR5YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGhiYS9oYTcvOTI4NTM1NjYxNzc1OHxiMjczYWJkNTMxYWM3Y2IyN2ZkZTM2MjhiNjQwNmQ0OGQyZmVhZjJlZTg0MjZmZWQ3MGFmNTk5ZjkzNzRmY2U1>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
16. Sartorius Stedim Biotech GmbH. Virosart® CPV MaxiCaps and Cartridges. Goettingen: Sartorius Stedim Biotech GmbH; 2011. Disponible en: [http://www.sartorius-sd.com.ua/files/Virus\\_filtration/Virosart\\_CPV\\_MaxiCapsCartridges.pdf](http://www.sartorius-sd.com.ua/files/Virus_filtration/Virosart_CPV_MaxiCapsCartridges.pdf). (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
17. Sartorius. Effect of flux decay on virus retention Virus clearance application note. Goettingen: Sartorius; 2015. Disponible en: <https://shop.sartorius.com/medias/Effect-of-Flux-Decay-on-Virus-Retention.pdf?context=bWFzdGVyfGRvY3VtZW50c3w2MzIwMDJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGg1Ni9oYzgvOTI0NDY4OTQzMjYwNnxjYTIyOWM3Zjk2ZTFIZDQ4YWY5YTk4ZTY4YjcwNTBhYmZmNjlkNmVjMWQ3ZGVjM2U2NWEzYmM3YjRiMDcxYWFk>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
18. Valdés-Balbin Y, Santana-Mederos D, Paquet F, Fernandez S, Climent Y, Chiodo F, et al. Molecular aspects concerning the use of the SARS-CoV-2 receptor binding domain as a target for preventive vaccines. *ACS Cent Sci*. 2021; 7(5):757-67. doi: <https://10.1021/acscentsci.1c00216>.
19. Portal-Miranda José A. Intervención sanitaria con candidatos vacunales, como estrategia temporal de enfrentamiento a la COVID-19, Cuba, 2021. *Rev Cubana de Salud Públ*. 2022;48(1):e3513. Disponible en: <https://revsaludpublica.sld.cu/index.php/spu/article/view/3513/1765>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).
20. Sánchez-Ramírez B, García-Rivera D, Valdés-Balbin Y, Rojas G, León-Monzón K, Ojito-Magaz E, et al. Development of a scalable single process for producing SARS-CoV-2 RBD monomer and dimer vaccine antigens. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1287551. doi: <https://10.3389/fbioe.2023.1287551>.
21. Cutler P. Size exclusion chromatography. En: *Wlaker JM, Papley R, editors. Molecular Biomethods Handbook*. Totowa NJ: Humana Press; 2008. p.719729.
22. Wu L, Mantas A, Gustafsson S, Manukyan L, Mihranyan A. Aggregate removal nanofiltration of human serum albumin solution using nanovellulose-based filter paper. *Biomedicines*. 2020; 8(7):209. doi: <https://10.3390/biomedicines8070209>.
23. Gustafsson S, Mihranyan A. Investigating protein throughput, v<sub>max</sub> values and virus removal efficiency of the paper based Mille-Feuille filter. Presentado en: 253rd American Chemical Society, National Meeting &

Exposition Advanced Materials, Technologies, Systems & Processes (ACS Spring 2017). Washington DC: SciMeetings; 2019. Disponible en: <https://scimeetings.acs.org/exhibit/Investigating-protein-throughput-vmax-values/2641408>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).

24. Patel J, Patel N, Shiyani R. Coefficient of variation in field experiments and yardstick thereof-an empirical study. *Curr Sci*. 2001;81(9):1163-4.

25. Rubio M, Gordillo A. Proceso continuo con reciclo: cultivos de alta densidad celular. *BioTecnología*.2021;25(2): 47-54. Disponible en: <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/09/Rubio-y-Gordillo-2021.pdf>. (Consultado en línea: 20 agosto de 2023).

---

## **Processability of nanofilters used in the purification of the recombinant receptor-binding domain protein of severe acute respiratory syndrome type 2 coronavirus**

### **Abstract**

The active pharmaceutical ingredient and the biological raw material, used for the formulation of the SOBERANA<sup>®</sup> vaccines, are produced at the Molecular Immunology Center. The antigen of these vaccines is the receptor-binding domain protein of the severe acute respiratory syndrome type 2 coronavirus. The production of this recombinant protein is based on the culture of Chinese hamster ovary cells in stirred tank bioreactors. The technological process on an industrial scale consists of several stages: preparation of culture media and solutions, fermentation, clarification of supernatant and purification. In biotechnological processes derived from cell lines of animal origin, endogenous or adventitious viral contamination is a potential risk. For this reason, a specific step for viral removal by nanofiltration is used in the purification process. The nanofilters used are disposable materials that significantly influence the cost of the process. The processing capacity of the nanofilters in the purification process in question is currently unknown, being the objective of the present investigation with a view to reducing production costs. The processing capacity of the *Virosart* CPV filters was determined to be 239.74 g/m<sup>2</sup> (71.67% saturation) and 1,259 g/m<sup>2</sup> (67.82% saturation) for the dimer species and the mixture, respectively. The decrease in the production cost of the nanofiltration stage was determined, representing a 54.85% decrease in the filtration cost for the dimer species and a 25% decrease for the mixture.

**Keywords:** filters; membrane filtration; nanopores; vaccines.

---

*Recibido: 18 de septiembre del 2023*

*Aceptado: 18 de marzo del 2024*