



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Proyecto de Título

EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD TÉCNICO-ECONÓMICA DE UNA PLANTA PRODUCTORA DE *rhBMP-2* PRODUCIDA EN CÉLULAS CHO

Alumnos: Germán Gerding Hermosilla
Andrea Müller Pavez

Profesores Guías: Claudia Altamirano Gómez
Julio Berríos Araya

JUNIO, 2014

Dedico el trabajo realizado a mi Papá, a mi Mamá, a Claudia y a toda mi familia, ya que sin sus consejos, confianza y amor no hubiera sido posible.

A mi abuela Lina, que sin duda estaría orgullosa de verme terminar mi carrera.

Andi, gracias por soportarme y trabajar conmigo durante este año, a pesar de las dificultades y las peleas, que simplemente fortalecieron nuestra amistad.

Y finalmente, a una persona que me acompañó desde los inicios de este proyecto, aconsejándome y sobre todo entendiéndome, a Verónica. Muchas gracias mi amor por estar siempre a mi lado y por motivarme para seguir adelante.

Germán.

*En primer lugar quisiera dedicar el trabajo
realizado a mi familia, por creer en mí,
comprenderme en mis momentos de estrés y
apoyarme incondicionalmente.*

*Y a mis amigos, por siempre estar ahí para un
momento de distracción y relax que me
permitía llegar con las pilas recargadas a
trabajar.*

*Además quisiera agradecer a Germán por
tenerme paciencia y porque aunque a veces
estábamos muy perdidos y desanimados, fue
un agrado trabajar contigo.*

Andi

:)

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la factibilidad técnico-económica de una planta productora de *rhBMP-2* producida en células CHO, con el fin de determinar si es posible la instalación de una planta de biofármacos genéricos en Chile.

Este trabajo adquiere relevancia al contextualizar dentro de las aplicaciones terapéuticas que poseen las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en su rol como osteoinductores para la regeneración de tejido óseo, permitiendo su utilización en las tres aplicaciones aprobadas por la FDA para la *rhBMP-2*. Estas corresponden a procedimientos de artrodesis lumbar anterior, tratamiento de fracturas tibiales abiertas agudas y a la elevación del seno maxilar acompañado del aumento de la cresta alveolar para implantes dentales, considerando los beneficios que trae su utilización y que son revisados a lo largo de este informe.

En el marco de los biofármacos genéricos es que se analiza el mercado de salud en el contexto nacional y a grandes rasgos el de otros países latinoamericanos para establecer las bases de un estudio de mercado que permita una aproximación a la demanda real de la proteína terapéutica y un análisis de su oferta considerando el mercado competidor. Sobre la base de dicho análisis se establece un volumen de producción de 1,537 g/año de *rhBMP-2* que corresponde a un 35% de la demanda estimada.

El proceso de producción de *rhBMP-2* se presenta principalmente en cuatro etapas: (1) La etapa de propagación de la línea celular productora: CHO_{*rhBMP-2*}. Esta es capaz de crecer en suspensión y medio libre de suero (Sección 3.2). (2) La etapa de producción que consta de dos sub-etapas: a) una fase donde se privilegia el crecimiento celular en cultivo por lotes y b) una fase de producción en cultivo continuo en perfusión y condiciones de hipotermia suave para favorecer la producción de la proteína recombinante (Sección 3.3). (3) La etapa de recuperación y purificación de *rhBMP-2*, fueron establecidas según la patente N° US 2013/0060012 A1 que se encuentra vigente, más no patentada en Chile por lo que puede ser usada libremente (Sección 3.4); y (4) La etapa de formulación final del producto, en la que se añaden los excipientes y se liofiliza para luego ser envasado (Sección 3.5).

Dadas las características de la industria farmacéutica nacional y de la regulación vigente para productos farmacéuticos, haciendo referencia que en Chile no existen actualmente empresas que produzcan biofármacos, se considera la implementación del proceso en un laboratorio farmacéutico ya establecido.

Con respecto a la evaluación económica, el proyecto se considera rentable dado que logra un VAN positivo y una TIR mayor a la TRMA fijada para el proyecto en el período de análisis, sin embargo, es necesario definir claramente cuál será el escenario en el que se comercializará el producto. Al situarse en un escenario realista, el análisis de sensibilidad muestra que efectivamente se logra un VAN positivo y una TIR de 30%, sin embargo, la recuperación del capital se logra después de la mitad de la vida estimada para el proyecto. Ello hace que resulte menos atractivo, y sumado a las contingencias especificadas en el Estudio de Mercado, se concluye que el proyecto presenta un riesgo bastante alto.

AGRADECIMIENTOS

De forma conjunta quisiéramos agradecer a la Escuela de Ingeniería Bioquímica por la formación entregada durante estos 6 años.

A nuestros profesores guías Claudia Altamirano y Julio Berríos por sus infaltables comentarios y observaciones que nos permitieron avanzar y elaborar un mejor trabajo; gracias por darnos la libertad de construir nuestra propia visión de la Ingeniería.

A Maritza, Claudia y Pabla por dedicarse con tan buena disposición a su trabajo y sobre todo por solucionar todos los problemas con los que aparecíamos en sus oficinas.

Finalmente, a nuestros compañeros, aquellos con los que tuvimos la suerte y el agrado de compartir clases y experiencias; por la enorme buena onda, confianza, respeto y cariño que fuimos construyendo estos años. ¡Grande Generación 2008!

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	viii

Capítulo 1 Introducción..... 1

1.1	Introducción	1
1.2	Proteínas Recombinantes.....	2
1.2.1	Recombinación	2
1.2.2	Modificaciones Post-Traduccionales	3
1.2.3	Impacto de las Proteínas Recombinantes en Medicina	4
1.3	Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP)	5
1.3.1	Osteogénesis	5
1.3.2	Proteínas Morfogenéticas Óseas y Súper-familia TGF- β	6
1.3.3	Familias BMP y BMP-2	7
1.3.4	Señalización y Función Fisiológica	9
1.3.5	Biosíntesis y Secreción	13
1.3.6	BMP en Regeneración Ósea y Usos Comerciales	14
1.4	Sistemas Biológicos de Expresión de Proteínas Recombinantes	15
1.4.1	Sistemas de Expresión Bacterianos	16
1.4.2	Sistemas de Expresión Eucariontes: Levaduras y Líneas Celulares de Insecto	16
1.4.3	Sistemas de Expresión Eucariontes: Líneas Celulares Mamíferas	17
1.4.4	Células de Ovario de Hámster Chino (Células CHO).....	22
1.5	Producción de <i>rhBMP-2</i> en Células de Ovario de Hámster Chino.....	22
1.5.1	Requerimientos Nutricionales y Medios de Cultivo.....	22
1.5.2	Modalidades de Cultivo	24
1.5.3	Mejoras y Optimizaciones para la Producción de <i>rhBMP-2</i>	25
1.5.4	Apoptosis y Muerte Celular	27
1.6	Objetivos	28
1.6.1	Objetivo General	28
1.6.2	Objetivos Específicos	28
1.7	Referencias Bibliográficas Capítulo 1.....	29

Capítulo 2 Estudio de Mercado, Capacidad y Ubicación de la Planta 35

2.1	Definición del Producto y Biogénéricos en Chile	35
2.2	Análisis Oferta	37
2.2.1	Contexto Nacional	38
2.2.2	Mercado Competidor	39
2.2.3	Proyecciones Optimistas y Pesimistas de la Oferta	44
2.3	Análisis de la Demanda.....	45
2.3.1	Demanda en Chile	45
2.3.2	Demanda en el Exterior	71

2.4	Análisis de Precios y Comercialización del Producto	76
2.5	Ubicación y Capacidad de la Planta	77
2.6	Conclusiones Generales del Estudio de Mercado	79
2.7	Referencias Bibliográficas Capítulo 2	80

Capítulo 3 Síntesis y Selección de Procesos..... 87

3.1	Esquema de Producción	87
3.2	Desarrollo de una Línea Celular Productora de <i>rhBMP-2</i>	88
3.2.1	Adaptación de las Células a Crecimiento en Suspensión	88
3.2.2	Adaptación de las Células para Crecimiento en Medio Libre de Suero	89
3.2.3	Métodos de Incorporación de ADN Exógeno	89
3.2.4	Sistema de Bancos Celulares	91
3.3	Producción de Proteínas Recombinantes	92
3.3.1	Medio de Cultivo	92
3.3.2	Condiciones de Operación	95
3.4	Recuperación y Purificación	103
3.4.1	Concentración del Producto	104
3.4.2	Separación por Cromatografía	104
3.4.3	Esquema del Proceso de Purificación	106
3.4.4	Filtración Inicial	107
3.4.5	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	107
3.4.6	Diafiltración	108
3.4.7	Cromatografía de Exclusión Molecular	108
3.5	Formulación Final	109
3.5.1	Adición de Excipientes	109
3.5.2	Esterilización	109
3.5.3	Distribución y Envasado	110
3.5.4	Liofilización	110
3.5.5	Etiquetado y Almacenamiento	110
3.6	Control del Proceso	110
3.6.1	Propagación	111
3.6.2	Producción	111
3.6.3	Recuperación y Purificación	112
3.6.4	Formulación Final del Producto	112
3.6.5	Resumen de Parámetros de Control y Técnicas de Análisis	112
3.7	Esquema de Producción de <i>rhBMP-2</i> en Células CHO	113
3.8	Referencias Bibliográficas Capítulo 3	114

Capítulo 4 Balances de Material y Energía 117

4.1	Etapa de Propagación	119
4.2	Etapa de Pretratamiento	120
4.2.1	Estanques de Mezclado (E-3/E-4) y Microfiltros de Esterilización (M-1/M-2)	120
4.2.2	Unión de Corrientes (U-1)	122
4.2.3	Estanques de Retención (E-5 y E-6)	123

4.3	Etapa de Producción.....	123
4.3.1	Estimación del Volumen de Reactor	124
4.3.2	Desarrollo de modelos matemáticos y métodos numéricos.....	127
4.3.3	Modalidad de Cultivo por Lote	129
4.3.4	Balance de Materia para la Etapa de Perfusión	133
4.4	Etapa de Recuperación y Purificación.....	137
4.4.1	Estanque de Almacenamiento (E-7)	137
4.4.2	Unidad de Ultrafiltración (UF-1) y Unión de Corrientes (U-2).....	137
4.4.3	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (C-1).....	140
4.4.4	Diafiltración (UF-2)	142
4.4.5	Cromatografía de Exclusión Molecular (C-2)	144
4.4.6	Rendimiento Global del Proceso de Recuperación y Purificación	146
4.4.7	Resumen de Corrientes del Proceso.	146
4.4.8	Balance de Agua del Proceso.	146
4.5	Etapa de Formulación Final	146
4.6	Referencias bibliográficas Capítulo 4.....	148
Capítulo 5 Balance de Energía, Diseño y Selección de Equipos		149
5.1	Propagación	149
5.2	Producción	152
5.2.1	Biorreactor (R-1).....	152
5.2.2	Estanques de Preparación de Medio de Cultivo (E-3 y E-4).....	161
5.2.3	Esterilización de Medio de Cultivo (M-1 y M-2)	166
5.2.4	Estanques de Almacenamiento de Medio de Cultivo y Producto (E-5, E-6 y E-7)....	169
5.3	Recuperación y Purificación	170
5.3.1	Filtraciones: Ultrafiltración (UF) y Diafiltración (DF).....	171
5.3.2	Cromatografías: Exclusión Molecular (SEC) y Interacción Hidrofóbica (HIC)	177
5.3.3	Resumen Etapa de Purificación	187
5.4	Formulación y Envasado	188
5.5	Equipos Auxiliares	189
5.5.1	Sistema de Purificación de Agua (W-1)	189
5.5.2	Bombas	195
5.6	Consumo Anual Hídrico y Energético	198
5.7	Diagrama de Flujo	199
5.8	Referencias Bibliográficas Capítulo 5	200
Capítulo 6 Organización de la Planta		203
6.1	Organización Administrativa	204
6.1.1	Secciones de Trabajo	205
6.2	Organización de Personas	207
6.2.1	Cargos Necesarios por Sección de Trabajo	207
6.2.2	Requerimientos de Personal.....	207
6.2.3	Jerarquía de Cargos	210
6.2.4	Jornadas de Trabajo.....	210

6.3	Organización de las Tareas de Producción	213
6.3.1	Plan de Producción	213
6.3.2	Planificación de Tareas: Diagrama de Gantt	214
6.3.3	Detección de Rutas Críticas: Malla Pert	216
6.4	Organización de la Planta	219
6.4.1	Requisitos de Instalaciones para la Industria Farmacéutica	219
6.4.2	Diseño de Instalaciones	219
6.4.3	Distribución Física del Proceso en la Planta: "Process Layout"	220
6.4.4	Propuesta de Diseño para la Construcción de la Planta de Producción	222
6.5	Referencias Bibliográficas Capítulo 6.....	232
Capítulo 7 Evaluación Económica		233
7.1	Capital de Inversión.....	234
7.1.1	Capital Fijo Directo (CFD)	234
7.1.2	Capital Fijo Indirecto (CFI)	240
7.1.3	Capital de Trabajo (WC)	241
7.1.4	Capital Total de Inversión	241
7.2	Costos Totales de Producción	242
7.2.1	Costos de Manufactura	242
7.2.2	Costos Generales de Producción	248
7.2.3	Costos de Producción	249
7.3	Ingresos.....	249
7.4	Flujo de Caja	250
7.5	Rentabilidad Económica.....	253
7.6	Análisis de Sensibilidad	254
7.6.1	Variación en la materia prima: Medio de Cultivo IMDM	254
7.6.2	Variación en Precio de Venta de <i>rhBMP-2</i>	255
7.6.3	Período de Retorno de Capital	256
7.6.4	Penetración Progresiva en el Mercado	256
7.7	Referencias Bibliográficas Capítulo 7	260
Capítulo 8 Discusión, Conclusiones y Recomendaciones		263
8.1	Discusión	263
8.2	Conclusiones	264
8.3	Recomendaciones	265
Capítulo 9 Nomenclatura		267
Apéndices		269

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1: Diferenciación de célula mesenquimal a osteocito.....	6
Figura 1.2: Esquema de intervención de BMP-2.....	7
Figura 1.3: Familias BMP.....	8
Figura 1.4: Estructura homodimérica de BMP-2.....	9
Figura 1.5: Esquema de la acción de señalización de las BMP.	11
Figura 1.6: Secuencia de construcción del dímero maduro de BMP-2	13
Figura 1.7: Métodos de transferencia de genes para introducir ADN exógeno en una célula	18
Figura 1.8: Establecimiento de línea celular para células mamíferas.	19

Capítulo 2

Figura 2.1: Formatos InFuse® Bone Graft	42
Figura 2.2: Gasto de bolsillo	47
Figura 2.3: Costo diario en hospital.....	48
Figura 2.4: Cobertura del día cama según previsión.....	48
Figura 2.5: Cobertura de medicamentos hospitalarios según previsión	49
Figura 2.6: Proyección de la población chilena entre 20 y 64 años.	50
Figura 2.7: Proyección ALIF bajo escenario pesimista.....	56
Figura 2.8: Proyección ALIF bajo escenario optimista.....	56
Figura 2.9: Proyección ALIF caso realista	57
Figura 2.10: Proyección OTF bajo escenario pesimista	63
Figura 2.11: Proyección OTF bajo escenario optimista	63
Figura 2.12: Proyección realista OTF	64
Figura 2.13: Proyección de injertos orales bajo escenario pesimista	69
Figura 2.14: Proyección injertos orales bajo escenario optimista.	70
Figura 2.15: Proyección injertos orales realista.....	70
Figura 2.16: Proyección población boliviana entre 20 y 64 años	72
Figura 2.17: Proyección población peruana entre 20 y 64 años	73
Figura 2.18: Proyección población ecuatoriana total.....	74
Figura 2.19: Proyección población argentina total	75

Capítulo 3

Figura 3.1. Esquema general del proceso para la producción de proteínas recombinantes.	87
Figura 3.2. Esquema de selección de mutantes utilizando MTX.	90
Figura 3.3. Esquema del sistema de Banco Celular.	91
Figura 3.4. Esquema de las etapas de recuperación y purificación de rhBMP-2.....	107
Figura 3.5. Esquema del proceso de producción de rhBMP-2 en células CHO.	113

Capítulo 4

Figura 4.1: Diagrama de Bloques para la producción de rhBMP-2 en células CHO.	118
Figura 4.2: Esquema de propagación.	120
Figura 4.3: Diagrama de bloques para etapa de preparación del medio de cultivo.	121
Figura 4.4: Diagrama para la unión de corrientes F-17 y F-18.	122
Figura 4.5: Diagrama de bloques para estanque equalizador E-3.	123
Figura 4.6: Comportamiento del cultivo por lote.	131
Figura 4.7: Comportamiento de las concentraciones de biomasa, sustratos y productos metabólicos durante la etapa de operación por lote.	132
Figura 4.8: Comportamiento de la concentración de biomasa durante la etapa de operación por lote, expresada en número de células por unidad de volumen.	133
Figura 4.9: Esquema del sistema de producción	133
Figura 4.10: Diagrama de bloques para el reactor en cultivo continuo	134
Figura 4.11: Comportamiento del cultivo continuo en perfusión hasta estado estacionario.	135
Figura 4.12: Comportamiento de la concentración de biomasa en cultivo continuo.	136
Figura 4.13: Diagrama de bloques de la unidad UF-1 y la unión U-2.	138
Figura 4.14: Diagrama de bloques de la unidad C-1.	140
Figura 4.15: Diagrama de bloques para la unidad UF-2.	142
Figura 4.16: Esquema de un sistema de diafiltración	142
Figura 4.17: Diagrama de bloques para unidad C-2.	145

Capítulo 5

Figura 5.1: T-Flask	149
Figura 5.2: Shaker.	150
Figura 5.3: Spinner Flask	151
Figura 5.4: Reactores Single-Use	153
Figura 5.5: Bolsa Single-Use. Cultibag® RM de Sartorius	154
Figura 5.6: Esquema de una bolsa Single-Use. Cultibag® RM de Sartorius	155
Figura 5.7: Panel calefactor BIOSTAT RM 20 50.	156
Figura 5.8: Esquema diseño de mezcladores.	162
Figura 5.9: Turbina de paletas inclinadas (Pitched-blade Turbine).	163
Figura 5.10: Cápsula de filtración Opticap® XL y soporte.	168
Figura 5.11: Bolsa SU Flexel® sin paleta agitadora y Palletank® de Sartorius Stedim.	170
Figura 5.12: Equipos Pellicon.	172
Figura 5.13: Columnas Cromatográficas	181
Figura 5.14: Sistema ÄKTApilot.	187
Figura 5.15: Proceso de envasado	189
Figura 5.16: Proceso de purificación de agua USP.	192
Figura 5.17: LabTower EDI™	193
Figura 5.18: Cabezal y motor de bomba peristáltica I/P® 82 Masterflex.	197
Figura 5.19: Diagrama de flujo	199

Capítulo 6

Figura 6.1: Organización administrativa de la planta.....	204
Figura 6.2: Organigrama jerárquico de la planta.	210
Figura 6.3: Diagrama de Gantt con planificación de tareas del proceso.	215
Figura 6.4: Malla PERT del proceso.	218
Figura 6.5: Plano general con etapas de construcción.....	223
Figura 6.6: Plano de Arquitectura del edificio de producción.	224
Figura 6.7: Plano de Distribución de equipamiento y equipos de procesos en planta (Layout). ...	225
Figura 6.8: Áreas de Servicio asociadas al edificio de producción.	226
Figura 6.9: Áreas disponibles para ampliación de la planta de producción.	227
Figura 6.10: Edificio de Control de Calidad.	228
Figura 6.11: Edificio de Investigación y Desarrollo.	229
Figura 6.12: Casino y estacionamientos.	230

Capítulo 7

Figura 7.1: Representación gráfica de VAN y TIR del proyecto.	253
Figura 7.2: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de materia prima.....	254
Figura 7.3: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta.....	255
Figura 7.4: Evolución del VAN y el TIR por período con Demanda Progresiva.....	258
Figura 7.5: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta del producto, considerando Demanda Progresiva.	259

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1

Tabla 1.1: Funciones conocidas de distintas BMP	12
Tabla 1.2: Acción de BMP en la formación de hueso	12

Capítulo 2

Tabla 2.1: Mercado farmacéutico Latinoamericano	38
Tabla 2.2: Uso de sustitutos de injerto óseo	41
Tabla 2.3: Ahorro e Ingresos en tratamiento con rhBMP-2	53
Tabla 2.4: Proyección del número anual de ALIF hasta 2023	55
Tabla 2.5: Grados de gravedad en OTF abiertas	58
Tabla 2.6: Comparación del tiempo promedio de unión de OTF	60
Tabla 2.7: Ahorro total por uso de rhBMP-2 por caso de recuperación de OTF grado III	61
Tabla 2.8: Proyección del número anual de OTF grado IIIA y IIIB hasta 2023	62
Tabla 2.9: Proyección del número de injertos requeridos en implantes dentales hasta 2023	68
Tabla 2.10: Resumen de la demanda chilena anual promedio	71
Tabla 2.11: PIB per cápita y población de los países de demanda exterior	72
Tabla 2.12: Demanda promedio en Bolivia	73
Tabla 2.13: Demanda promedio en Perú	74
Tabla 2.14: Demanda promedio en Ecuador	75
Tabla 2.15: Demanda promedio en Argentina	76
Tabla 2.16: Demanda anual total y demanda a suplir	78

Capítulo 3

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo IMDM	94
Tabla 3.2: Características de Filtros Vórtex-Flow y Spin-filter	102
Tabla 3.3: Comparación de dispositivos de retención celular	102
Tabla 3.4: Rendimiento y pureza de rhBMP-2 recuperada de cada etapa de purificación	106
Tabla 3.5: Características de la membrana de ultrafiltración seleccionada	107
Tabla 3.6: Características del medio Butyl-Sepharose 4 Fast Flow	108
Tabla 3.7: Características del medio Sephacryl S-100	109
Tabla 3.8: Resumen de técnicas de control para cada parámetro	112

Capítulo 4

Tabla 4.1: Protocolo de propagación para obtener el inóculo del reactor	119
Tabla 4.2: Descripción de corrientes de preparación de medio de cultivo	122
Tabla 4.3: Descripción de corrientes de estanques de retención	123
Tabla 4.4: Estimación del número de lotes a producir en un año	126
Tabla 4.5: Descripción de corrientes en Cultivo por Lotes	129

Tabla 4.6: Valores de constantes utilizados para el modelo de balance de masa.....	129
Tabla 4.7: Condiciones de inicio y término del cultivo por lote.	130
Tabla 4.8: Datos considerados para el sistema de perfusión a 37 [°C] y 31 [°C].	135
Tabla 4.9: Descripción de corrientes de cultivo continuo.....	136
Tabla 4.10: Descripción de las corrientes de UF-1 y U-2.	139
Tabla 4.11: Composición de soluciones buffer a utilizar en HIC.....	141
Tabla 4.12: Descripción de las corrientes de C-1.	141
Tabla 4.13: Descripción de las corrientes de UF-2.....	144
Tabla 4.14: Composición final del producto purificado.....	145
Tabla 4.15: Resumen de composiciones de corrientes y balances de masa del sistema.	147

Capítulo 5

Tabla 5.1: Materiales Propagación.....	151
Tabla 5.2: Potencia de equipos en etapa de propagación.	152
Tabla 5.3: Principales Características Reactor BIOSTAT RM 50.....	157
Tabla 5.4: Requerimientos para aireación.	159
Tabla 5.5: Condiciones de operación del biorreactor.	160
Tabla 5.6: Calor de fermentación.....	160
Tabla 5.7: Consumo energético estimado para biorreactor.	161
Tabla 5.8: Relaciones recomendadas.	162
Tabla 5.9: Dimensiones de E-3 y E-4.	164
Tabla 5.10: Condiciones de agitación y potencia para un estanque.	166
Tabla 5.11: Características Opticap® XL 2.....	167
Tabla 5.12: Parámetros de operación de la filtración.	168
Tabla 5.13: Características módulo de ultrafiltración.....	173
Tabla 5.14: Parámetros operacionales de diafiltración.....	174
Tabla 5.15: Características de isopropanol.	175
Tabla 5.16: Diafiltración.	175
Tabla 5.17: Tiempo de diafiltración según el área de cassette.	177
Tabla 5.18: Parámetros operacionales de SEC.....	177
Tabla 5.19: Coeficientes de difusividad.....	179
Tabla 5.20: Datos para el diseño de la columna SEC.....	179
Tabla 5.21: Alturas SEC para columnas 140 y 200.	181
Tabla 5.22: Tabla comparativa de razones v/L.	182
Tabla 5.23: Tabla resumen de características columna AxiChrom 140.....	183
Tabla 5.24: Parámetros operacionales de HIC.....	184
Tabla 5.25: Alturas SEC para columnas 140 y 200.	185
Tabla 5.26: Tabla resumen de características columna AxiChrom 200.....	186
Tabla 5.27: Tabla de flujos en operaciones de recuperación y purificación.	187
Tabla 5.28: Potencia de equipos en la etapa de purificación.....	188
Tabla 5.29: Tipificación de aguas purificadas según ASTM y USP.....	191
Tabla 5.30: Características Agua Purificada por LabTower ^{EDITM}	194
Tabla 5.31: Dimensiones de estanque E-1 y E-2.....	195
Tabla 5.32: Resumen condiciones operacionales de las bombas.....	197
Tabla 5.33: Consumo anual de agua.....	198
Tabla 5.34: Consumo anual de electricidad.....	198

Capítulo 6

Tabla 6.1: Cargos de trabajo por sección.	207
Tabla 6.2: Estudios requeridos y número de puestos de trabajo por cargo.	209
Tabla 6.3: Clase de horario para cada cargo de la empresa.	211
Tabla 6.4: Horario de trabajo para las modalidades de turnos.	212
Tabla 6.5: Estimación del número de lotes a producir de acuerdo a la demanda proyectada.	213
Tabla 6.6: Lista de actividades para creación de malla PERT.	217
Tabla 6.7: Dimensiones y área en suelo de equipos de procesos.	221
Tabla 6.8: Dimensión total de las instalaciones de la planta.	221
Tabla 6.9: Dimensión total de las instalaciones de la planta de producción.	222

Capítulo 7

Tabla 7.1: Indicadores económicos utilizados.	233
Tabla 7.2: Costos de equipos del procesos productivo.	238
Tabla 7.3: Porcentajes de costos asociados al Capital fijo directo.	239
Tabla 7.4: Capital fijo directo.	240
Tabla 7.5: Capital fijo indirecto (CFI)	241
Tabla 7.6: Capital total de inversión.	242
Tabla 7.7: Costo anual de agua y electricidad.	243
Tabla 7.8: Costo de mano de obra según departamento.	245
Tabla 7.9: Costos de manufactura.	248
Tabla 7.10: Costos de producto.	249
Tabla 7.11: Ingresos por venta.	250
Tabla 7.12: Reinversión de material.	251
Tabla 7.13: Flujo de caja del proyecto.	252
Tabla 7.14: Período de Retorno de Capital para ambas variaciones.	256
Tabla 7.15: Proyección de la demanda que se pretende abarcar en cada período.	257
Tabla 7.16: Variación en el precio de venta, bajo el supuesto de demanda progresiva.	258

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la regeneración ósea ha adquirido una gran relevancia en el área de la salud debido a la creciente necesidad de buscar nuevas tecnologías y tratamientos que permitan reducir tiempos de operación y recuperación, la morbilidad de los procedimientos y los riesgos de infección asociados a las intervenciones que tratan un amplio tipo de lesiones traumatológicas y odontológicas. Desde esa perspectiva, el desarrollo y comercialización de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) ha permitido solucionar en parte estos problemas, gracias a su alta capacidad osteoinductora. Sin embargo, la gran limitante hoy en día es su elevado costo, por lo que la generación de este tipo de fármacos como genéricos permitiría aumentar el uso de esta proteína como regenerador óseo.

En el marco de los biofármacos genéricos, aquellos fármacos obtenidos a partir procesos biotecnológicos cuyas patentes ya han caducado, este proyecto pretende evaluar la factibilidad de instalar una planta productora de *rhBMP-2* en una línea de células CHO, desde una perspectiva de mercado, técnica y de rentabilidad económica.

En la primera parte de este proyecto se revisan los antecedentes bibliográficos considerados relevantes para la comprensión del proyecto y se presentan los objetivos que guían el desarrollo del mismo.

En una segunda parte, se realiza el estudio de mercado en el que se define el producto a elaborar y se realizan los análisis de oferta, demanda y su proyección tanto en el territorio nacional como internacional. De esta forma se podrá tener una visión más acabada de las actuales condiciones y del contexto del mercado de la regeneración ósea, que permita definir si es conveniente la instalación de la planta desde el punto de vista de la demanda y determinar la locación y capacidad productiva de la misma.

La tercera parte del proyecto, comprende la evaluación técnica del mismo, en la que se incluyen los capítulos de síntesis y selección de procesos y de balances de masa y energía. Con los que se pretende definir los pasos a seguir para la producción de la proteína, las condiciones de operación de la planta, la cantidad, tipo y dimensionamiento de los equipos involucrados, y los flujos de material y requerimientos energéticos de la misma. Esto permitirá establecer gran parte de la factibilidad técnica de la instalación de una planta productora de este biofármaco.

En una cuarta parte, se define la estructura y organización de la planta y se realiza la evaluación económica, estableciendo las secciones de trabajo en la planta, planificación de la producción, análisis de costos, flujo de caja y análisis de sensibilidad correspondientes, así como también la especificación de la inversión inicial, distintos métodos de financiamiento y la tasa de ganancia. De esta forma la idea es obtener todas las cifras que permitan realizar la evaluación económica del proyecto apuntando a determinar la rentabilidad de éste bajo criterios definidos.

Finalmente se presentan las discusiones, conclusiones y recomendaciones generales del proyecto, respecto a la factibilidad técnico-económica y de mercado, en base a los datos obtenidos y criterios establecidos en cada una de sus partes.

1.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

1.2.1 Recombinación

Dado que las proteínas cumplen funciones tan fundamentales para la vida como catalizar reacciones metabólicas, formar complejos biológicos, y ser responsables de interacciones intra e intercelulares, así como también de eventos de señalización celular (Ferrer-Miralles, Domingo-Espín, Corchero, & E. Vázquez, 2009); es que es de gran interés para la industria farmacéutica la producción de éstas. Es así, como hace aproximadamente 40 años, la investigación en torno al desarrollo de proteínas mediante un proceso controlado, derivó en la producción de proteínas sintetizadas en células hospedadoras tratadas bajo procedimiento de ingeniería genética para albergar genes que codifican dichas proteínas (Jayapal, Wlaschin, Hu, & Yap, 2007); denominando proteína recombinante al producto obtenido.

La recombinación es definida como un proceso en el que las moléculas de DNA se rompen y los fragmentos se vuelven a soldar siguiendo combinaciones nuevas; pudiendo ocurrir tanto de forma *in vivo* como *in vitro* (Alberts *et al.*, 2004). De esta forma, para efectos de proteínas recombinantes, una vez que el gen que codifica la proteína de interés ha sido clonado y secuenciado, es posible expresar dicha proteína en altas concentraciones, utilizando vectores de expresión, como por ejemplo virus y/o plásmidos, diseñados para incorporar la secuencia completa de proteínas en diferentes sistemas celulares referidos como hospederos (Scott, 2009), cumpliéndose un proceso de recombinación. Entonces, una proteína recombinante se refiere básicamente a aquella proteína cuyo código es llevado y expresado por una célula recombinante.

Tal como ya se ha destacado, el desarrollo de este tipo de procedimientos lleva más de 30 años, pues ya a fines de la década de 1970, tecnologías de DNA recombinante (rDNA) generaron un set de plataformas técnicas en *E.coli* permitiendo la producción controlada y escalable de proteínas (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Luego, a principios de la década de 1980, ingresa al mercado la primera proteína recombinante farmacéutica, correspondiente a la recombinante humana (*rh*) de insulina producida en *E.coli* (White, 2010) (Melmer, 2005). Posterior a ello, la primera proteína recombinante producida en células mamíferas, aprobada para su utilización clínica cerca del año 1987, fue el activador tisular del plasminógeno (r-TPA), sintetizado utilizando la línea celular ovario de hámster chino (CHO por su sigla en inglés) (Palomares, Estrada-Mondaca, & Ramírez, 2004) (Wurm, 2004) (Jayapal *et al.*, 2007). De esta forma, la demanda de proteínas recombinantes ha aumentado a medida que ha habido un incremento en la disponibilidad de organismos manipulados para la producción de éstas, así como también distintas aplicaciones de estas proteínas se han vuelto realidad en el mundo comercial (Palomares *et al.*, 2004).

1.2.2 Modificaciones Post-Traduccionales

En muchos casos la producción de proteínas recombinantes es un desafío, debido a las eficiencias de producción y altos costos del producto final (Palomares *et al.*, 2004); como también, debido a que estas proteínas deben ser sintetizadas en formas que sean biológicamente activas para su real efectividad, requiriendo un adecuado plegamiento y posibles modificaciones post-traduccionales (Jayapal *et al.*, 2007).

El plegamiento es un proceso complejo en el que intervienen principalmente dos proteínas: foldasas, encargadas de acelerar el plegamiento en sí; y chaperonas, que previenen la formación de

plegamientos improductivos e intermediarios insolubles (Ailor & Betenbaugh, 1999). Esta etapa del proceso es fundamental, pues entrega a la proteína características específicas que permiten su adecuado funcionamiento, como por ejemplo sitios de reconocimiento; así un plegamiento incorrecto conllevaría varias consecuencias adversas (Palomares *et al.*, 2004).

Por otro lado, respecto a las modificaciones post-traduccionales, una de las más importantes en proteínas de origen eucariota es la glicosilación, pues puede llegar a determinar la estabilidad de la proteína, además de su solubilidad, antigenicidad, actividad biológica, vida media en la circulación e incluso el plegamiento; por lo que es esencial en proteínas destinadas a uso terapéutico (Palomares *et al.*, 2004). Se define como el proceso de adición de uno o más azúcares o fragmentos de carbohidratos a una molécula lipídica o proteica (en cuyo caso se adiciona a residuos aminoacídicos específicos) (Alberts *et al.*, 2004) (Jayapal *et al.*, 2007). La glicosilación requiere de bastantes pasos, involucrando decenas de enzimas y sustratos, produciéndose usualmente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi de las células eucariontes; así se han identificado N-glicosilaciones, O-glicosilaciones y glicosilaciones C (Palomares *et al.*, 2004). De las anteriores, las más frecuentes y mejor estudiadas son las N-glicosilaciones, en las que se añade un oligosacárido a través del grupo NH_2 de la cadena lateral de una asparagina; y las O-glicosilaciones, que corresponden a la adición del oligosacárido a través del grupo OH de la cadena lateral de una serina o una treonina (Alberts *et al.*, 2004).

Considerando los requerimientos de la producción una proteína recombinante biológicamente activa, se puede destacar entonces que las condiciones del bioproceso no sólo afectan la cantidad producida, sino su calidad, pues tanto las condiciones de cultivo como las características del medio influyen en la correcta glicosilación y plegamiento de la proteína (Palomares *et al.*, 2004).

1.2.3 Impacto de las Proteínas Recombinantes en Medicina

La terapia por medio de proteínas recombinantes ha cambiado el perfil de la medicina moderna y continúa proporcionando terapias innovadoras y efectivas para numerosas enfermedades antes catalogadas como refractarias (Jayapal *et al.*, 2007). Es un hecho que desde que se lanzó al mercado la insulina recombinante en 1982, hasta el año 2000, un total de 84 biofármacos innovadores para la administración humana fueron aprobados en los EE.UU y/o en la Unión Europea (Melmer, 2005). Y aun cuando, las primeras proteínas recombinantes autorizadas para el uso terapéutico en humanos fueron producidas en bacterias (principalmente *E.coli*), dentro de los registros de

aprobación de la Food & Drug Administration (FDA) de EE.UU entre los años 1996 y 2000, 21 de los 33 productos aprobados corresponden a células animales (Palomares *et al.*, 2004). Esta razón se mantuvo similar hasta el año 2004, año en el que se registró que entre un 60 y 70% de todas las proteínas recombinantes farmacéuticas eran producidas en células mamíferas (Wurm, 2004), debido principalmente a que las complejas glicosilaciones no pueden ser logradas por organismos procariontes o eucariontes más sencillos (Palomares *et al.*, 2004). Finalmente, el éxito de este tipo de biofármacos ha radicado principalmente en dos hechos: la droga recombinante ha reemplazado a un producto ya establecido que se recupera de fuentes naturales y la presencia o actividad biológica del producto natural se daña debido a deficiencias en el paciente afectado (Melmer, 2005), implicando la preferencia por la solución recombinante. Así, se espera el auge de la producción de proteínas recombinantes en la industria farmacéutica.

1.3 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMP)

Para comprender de mejor forma la función de las proteínas morfogenéticas óseas, es necesario en primer lugar conocer el proceso de diferenciación celular involucrado en la formación de hueso más conocido como osteogénesis.

1.3.1 Osteogénesis

Es sabido que la formación de tejidos se relaciona directamente con la diferenciación celular, involucrando células indiferenciadas que son estimuladas por diversas señales del ambiente generando así células específicas o diferenciadas. De acuerdo a lo anterior, es que muchos tejidos cuentan además con la capacidad de regeneración a través del mecanismo de diferenciación de células mesenquimales (indiferenciadas) o bien medianamente diferenciadas.

En particular, los huesos tienen una notable capacidad de regeneración que habilita su reparación en casos de lesiones, induciéndose la formación de nuevo tejido óseo. Así, las células mesenquimales son estimuladas por moléculas señales (especificadas más adelante) para diferenciarse en osteoblastos (células medianamente diferenciadas) y finalmente en osteocitos (células óseas completamente diferenciadas) (Ver Figura 1.1).

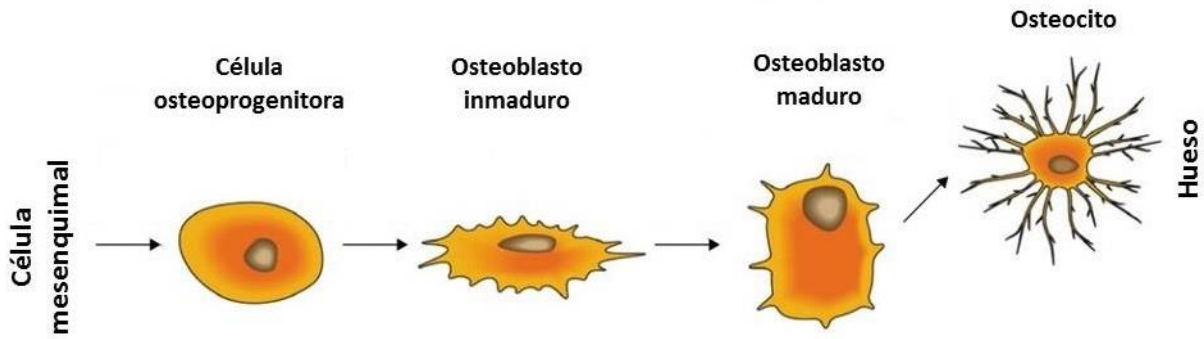


Figura 1.1: Diferenciación de célula mesenquimal a osteocito. Se muestran de forma general las etapas del proceso que lleva a una célula mesenquimal (indiferenciada) a su completa diferenciación como osteocito.

Imagen modificada (Wang, Schröder, Wiens, Ushijima, & Müller, 2012).

1.3.2 Proteínas Morfogenéticas Óseas y Súper-familia TGF- β

Las proteínas morfogenéticas óseas o BMP (por su sigla en inglés: bone morphogenetic protein) son autacoides (hormonas locales o moléculas señales) multifuncionales (Matthews, 2005) descubiertas por M. Urist (1965). Representan a una larga familia de proteínas estructuralmente relacionadas a los factores transformadores de crecimiento o TGF- β que tienen efecto en muchos tipos de tejidos corporales, modulando el crecimiento embriológico y la diferenciación, así como también la función celular (Matthews, 2005) (Sykaras & Opperman, 2003) (Garrison *et al.*, 2010).

La superfamilia de las TGF- β , comprende una gran familia de proteínas de secreción, relacionadas estructuralmente, que actúan como hormonas y mediadores locales, regulando un amplio número de funciones en animales, incluso durante el desarrollo (Alberts *et al.*, 2004). Corresponden a factores tanto de crecimiento (aumento en el número celular) como de diferenciación (maduración de células indiferenciadas) relacionados según su secuencia aminoacídica (Wozney, 2002).

Todos los factores involucrados se caracterizan por formar estructuras diméricas unidas por un puente disulfuro, en las que además, cada subunidad contiene adicionalmente tres puentes disulfuros intracatenarios (Wozney, 2002). Considerando lo mencionado, es que se destaca que la familia de las BMP constituye la mayor parte de todos los factores pertenecientes a los TGF- β (Wozney, 2002).

Las BMP corresponden concretamente a factores de diferenciación secretados por células, que causan la maduración de células mesenquimales a células formadoras de huesos o cartílago (Wozney, 2002) (ver Figura 1.2); promoviendo el reclutamiento y crecimiento de osteoblastos y manteniendo el fenotipo de éstos (Vukicevic & Sampath, 2009). Estas proteínas han mostrado ser las únicas capaces de iniciar el proceso de osteogénesis *in vivo*, tanto así que la cantidad de BMP está fuertemente relacionada con la cantidad de hueso nuevo formado (Mardegan, Nascimento, Santos, Silva, & Mizusaki, 2006).

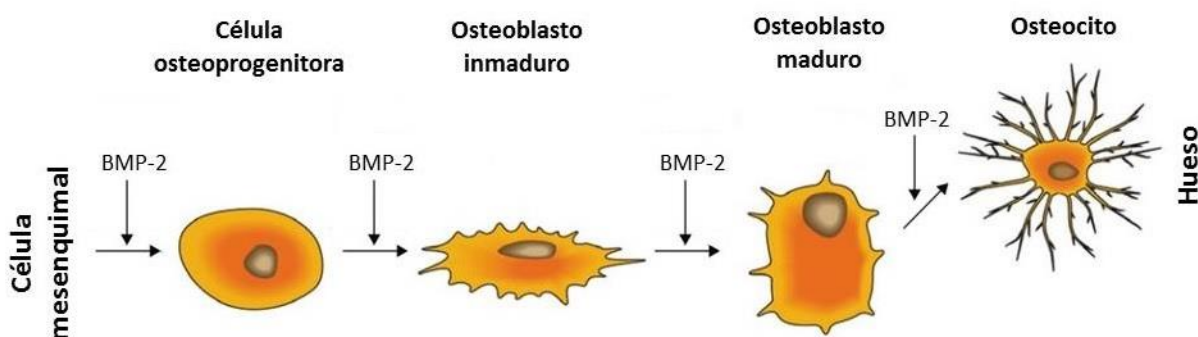


Figura 1.2: Esquema de intervención de BMP-2. En general el campo de acción de las BMP radica en el proceso de diferenciación de las células mesenquimales a osteocitos. En esta imagen se ejemplifica de forma esquemática la función específica de BMP-2. Imagen modificada de (Wang et al., 2012).

Por otro lado, la función de estas proteínas abarca la regulación de procesos biológicos desde la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y determinación del destino celular, hasta la morfogénesis y el desarrollo embrionario (Hogan, 1996). Además se han reportado nuevos campos en los que actúan este tipo de proteínas, como por ejemplo en el desarrollo del sistema nervioso, pulmones, riñones, gónadas y estómago (Hogan, 1996) (Matthews, 2005).

1.3.3 Familias BMP y BMP-2

Desde su descubrimiento en el año 1965 hasta hoy, se ha descrito una gran cantidad de proteínas que presentan características correspondientes a BMP; conformando de esta manera un grupo de aproximadamente 20 BMP. Así, tal como la superfamilia TGF- β comprende una similitud en la composición aminoacídica, las BMP también se encuentran distribuidas en familias de acuerdo a similitud en la secuencia de aminoácidos (Wozney, 2002) (ver Figura 1.3).

Esta comparación entre secuencias aminoacídicas ha determinado, por ejemplo, cerca de un 90% de similitud entre BMP-2 y BMP-4, agrupándolas en una familia (Wozney, 1992) (Mardegan *et al.*, 2006). Por otro lado, la familia BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP-1) y BMP-8 (OP-2) corresponden a proteínas un poco más largas que la familia de BMP-2 y tienen aproximadamente un 70% de identidad en la secuencia aminoacídica con los otros subgrupos BMP (Wozney, 2002).

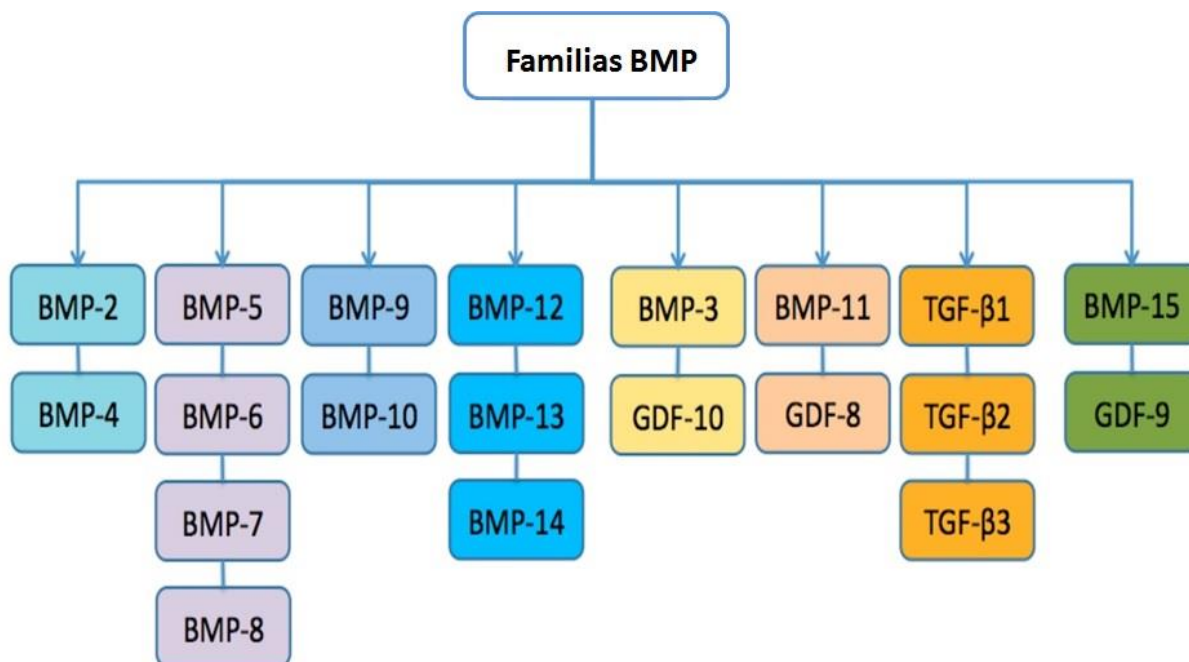


Figura 1.3: Familias BMP. Agrupación de los distintos tipos de BMP de acuerdo a similitudes en sus secuencias aminoacídicas. Imagen modificada de (Zhou, 2008).

Las BMP contienen característicamente siete residuos de cisteína, seis de los cuales forman un nudo; mientras que el último es utilizado en la dimerización con otro monómero (Xiao, Xiang, & Shao, 2007). Además, las BMP y sus equivalentes recombinantes producidas en células mamíferas, son modificadas luego de la traducción a través de una N-glicosilación (Sampath *et al.*, 1990). De esta forma e incluyendo las características antes mencionadas, específicamente la BMP-2 (también conocida como dibotermín alfa) corresponde a un polipéptido homodimérico glicosilado que contiene alrededor de 115 aminoácidos y una masa molecular cercana a 30 kDa (Kim *et al.*, 2011) (ver Figura 1.4). Adicionalmente, se trata de una molécula osteoinductora capaz de formar tanto

hueso como cartílago; y es esencial en la diferenciación de osteoblasto a osteocito (Mardegan *et al.*, 2006).

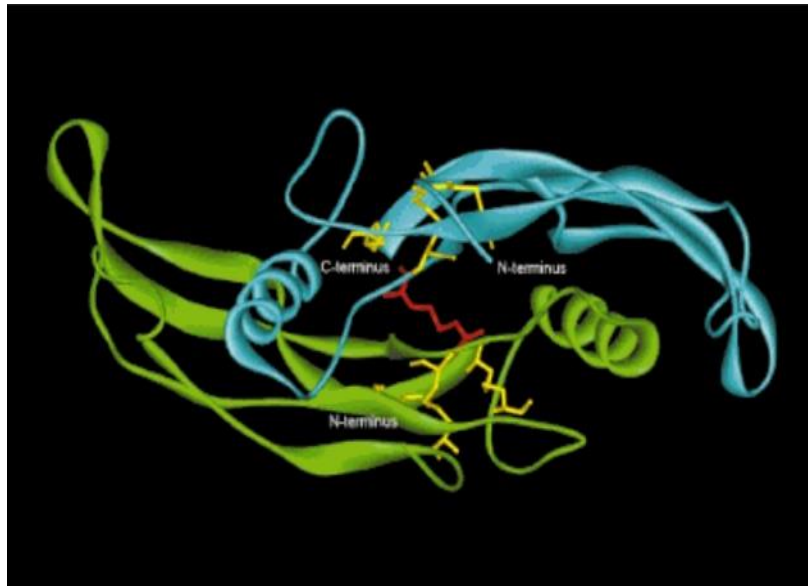


Figura 1.4: Estructura homodimérica de BMP-2. Las zonas de color verde y celeste corresponden a dos cadenas polipeptídicas idénticas; en amarillo se destacan los puentes disulfuro en los nudos de cisteína; y en rojo se observa el puente disulfuro intercatenario. Imagen modificada de (Laub, Seul, Schmachtenberg, & Jennissen, 2001).

1.3.4 Señalización y Función Fisiológica

Durante años, el modo de acción de las BMP era desconocido, si bien se conocía que corresponden a proteínas de carácter extracelular, y que dadas las funciones observadas, se trata de moléculas señales; no se conocía exactamente la ruta de señalización que llevaban a cabo. Hoy la teoría dice que las BMP se unen a receptores de membrana tipo BMPRI y BMPRII, así como también de tipo IA y IB, que difieren tanto en su distribución espacial como temporal (según el nivel de diferenciación celular o edad de la célula), lo que podría generar diversos efectos en diferentes tipos celulares (Matthews, 2005).

Los receptores BMPRI y BMPRII contienen un dominio extracelular de unión al ligando (BMP), un dominio transmembranal y finalmente un dominio intracelular quinasa serina-treonina (Sieber,

Schwaerzer, & Knaus, 2009). Una vez unida la BMP al dominio extracelular del receptor, se genera una cadena de fosforilación en que el último factor de transcripción fosforilado, en conjunto con otros agentes activadores, fomenta la expresión de ciertos genes diana (Matthews, 2005) (ver Figura 1.5).

Todo inicia con la unión de BMP a estos receptores, haciendo que BMPRII fosforile a BMPRI activando el dominio quinasa antes mencionado; lo que permite la fosforilación de factores de transcripción llamados Smad. Estos factores Smad, proteínas que median las señales intracelulares llevando información de señales extracelulares al núcleo (Xiao *et al.*, 2007) y que regulan la transcripción de distintos genes blanco, están divididos en tres tipos: R-Smad (asociado al receptor), Co-Smad (mediador común) e I-Smad (inhibidor) (Sieber *et al.*, 2009). Así, los R-Smad fosforilados forman un complejo heterodimérico con los Co-Smad translocándose al núcleo celular, dónde se coordinan con otros factores de transcripción para regular la expresión de genes diana; finalizándose el proceso de señalización con la degradación de las R-Smad por medio de proteosomas (Vukicevic & Sampath, 2009). Por otro lado, el rol de los I-Smad es inhibir esta señalización producida por BMP al impedir la fosforilación, induciendo una regulación negativa para mantener el equilibrio de la activación de genes (Vukicevic & Sampath, 2009).

Otras moléculas reguladoras de la función de señalización de las BMP son las Smurf y otras moléculas antagonistas solubles como noggins, chordin, gremlin, entre otras. Por un lado, de forma intracelular, las Smurf inducen la exportación de I-Smad al citosol para incrementar la interacción con los receptores BMPRI y así también la inhibición de la señalización BMP (Sieber *et al.*, 2009). Mientras que de forma extracelular, se encuentran las proteínas antagonistas mencionadas (entre varias otras), impidiendo una adecuada interacción BMP-receptor (Vukicevic & Sampath, 2009).

La variedad de receptores involucrados y la cantidad de rutas que regulan, junto con el hecho que las BMP existen en forma homodimérica, sugiere la existencia de efectos sinérgicos o de red; lo que lleva la atención al nivel de complejidad de este sistema de señalización en cascada y la posible variabilidad de las respuestas “downstream” a la unión BMP-receptor (Sykaras & Opperman, 2003).

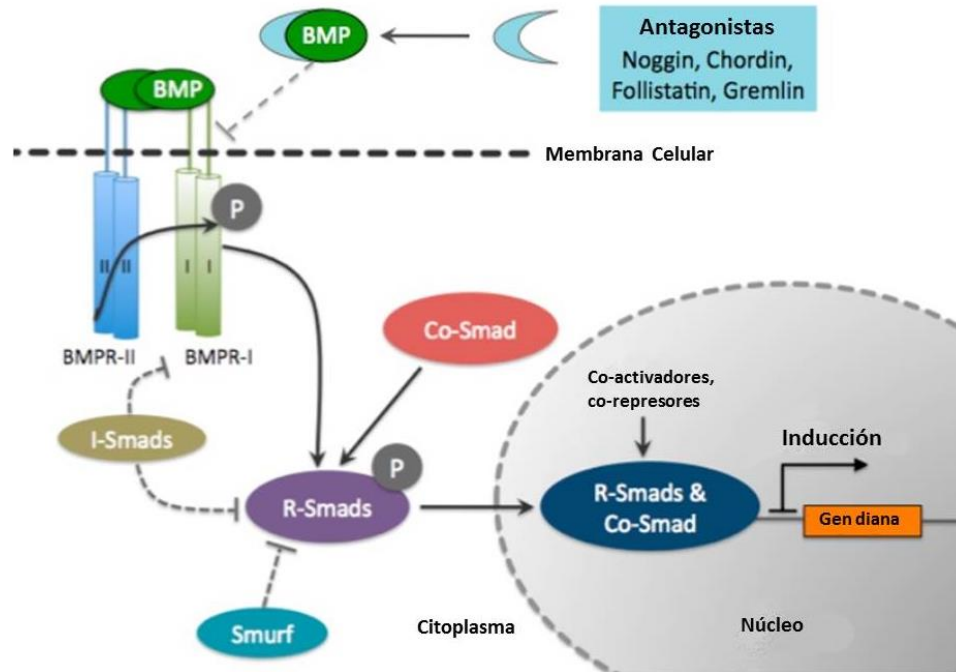


Figura 1.5: Esquema de la acción de señalización de las BMP. Una vez que la BMP se ha unido a los receptores (BMPRI y BMPRII), se genera una cadena de fosforilación iniciada por BMPRII en la que finalmente las Smad inducen la transcripción de ciertos genes diana en el núcleo. Por otro lado, agentes como las Smurf, I-Smad; y moléculas antagonistas como noggin y chordin, evitan la acción de la correcta acción de las BMP tanto intra- como extracelularmente. Imagen modificada de (Zhou, 2008).

Como ya se mencionó con anterioridad, la cantidad de BMP está relacionada directamente con la cantidad de hueso formado. Y tanto es así, que a bajas concentraciones las BMP pueden estimular la proliferación celular y la formación de cartílago, mientras que en altas concentraciones, se promueve la diferenciación celular específicamente a hueso (excluyendo una primera etapa de formación de cartílago) (Hogan, 1996) (Wozney, 2002).

Por otro lado, se ha destacado que los distintos tipos de BMP pueden ser específicos para cumplir ciertas funciones fisiológicas, o bien, están presentes en diferentes contextos fisiológicos (ver Tablas 1.1 y 1.2) (Suk, 2009). Así como también, dado que no se han estudiado con la misma profundidad todas las BMP conocidas, puede que incluso falten unas por conocer y que los estudios se han concentrado básicamente en BMP-2 y BMP-7, es que no está claro si los otros tipos de BMP tengan igual o incluso mayor capacidad de inducir la formación de hueso (Matthews, 2005).

Tabla 1.1: Funciones conocidas de distintas BMP. Modificado de (Xiao et al., 2007).

BMP	Función
BMP-1	Es una metaloproteasa que actúa en procolágeno I, II y III. Está involucrada en el desarrollo de cartílago
BMP-2	Induce la formación de cartílago y hueso. Tiene rol clave en la diferenciación de osteoblastos
BMP-3	Induce la formación de hueso
BMP-4	Regula la formación de dientes, miembros y hueso desde el mesodermo. Tiene un rol en la reparación de fracturas
BMP-5	Tiene acción en el desarrollo de cartílago
BMP-6	Tiene rol clave en la integridad de las articulaciones en adultos
BMP-7	Tiene rol clave en la diferenciación de osteoblastos. Induce la formación de I-Smad. Es clave en el desarrollo y reparación renal
BMP-8	Involucrada en el desarrollo de hueso y cartílago
BMP-10	Tiene acción en la trabeculación en el corazón embrionario
BMP-15	Puede tener un rol en el desarrollo folicular y de ovocitos

Tabla 1.2: Acción de BMP en la formación de hueso. Modificado de (Suk, 2009).

Etapas	Acción de BMP
Quimiotaxis	Estimulan la migración de células mesenquimales al área de implantación
Angiogénesis	Estimulan a osteoblastos para la liberación de factores de crecimiento (VEGF), lo que causa el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos
Proliferación	Causan la división y proliferación de células mesenquimales en dos células hijas de la célula original
Diferenciación de condrocitos	Bajas dosis de BMP inducen la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos
Diferenciación de osteoblastos	Altas dosis de BMP inducen la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos
Formación de hueso endocondral	Inician una serie de eventos que resultan en la formación de cartílago, remoción de éste y reemplazo a través de la formación de hueso
Formación de hueso directa	Altas concentraciones de BMP causan la formación de hueso simultáneamente a la formación de cartílago, sugiriendo osificación directa (intramembranosa)

1.3.5 Biosíntesis y Secreción

En lo que respecta a la biosíntesis, a grandes rasgos, la mayoría de los miembros de la superfamilia TGF- β , incluyendo las BMP, son sintetizadas en forma de moléculas precursoras y luego, durante el proceso de secreción celular, se produce la separación del propéptido de la zona madura y activa (Wozney, 2002).

Específicamente, las moléculas BMP son sintetizadas como largos precursores, que contienen una extensión hidrofóbica señal de 50 a 100 aminoácidos N-terminal; y además cuentan con secuencias de propéptidos (prodominio) unidas también a una región madura C-terminal (ver Figura 1.6) (Sykaras & Opperman, 2003) (Xiao *et al.*, 2007) (Sieber *et al.*, 2009). Previo a la secreción, se realiza el clivaje del péptido señal en el retículo endoplasmático, liberando la zona madura para formar un dímero, produciendo finalmente el retiro del prodominio en el aparato de Golgi; además se realiza el proceso de glicosilación de la proteína, obteniendo una proteína que es secretada (Hogan, 1996) (Sykaras & Opperman, 2003) (Xiao *et al.*, 2007) (Sieber *et al.*, 2009). Luego de la secreción la proteína dimérica el prodominio es cortado, activando de forma completa la BMP (Xiao *et al.*, 2007).

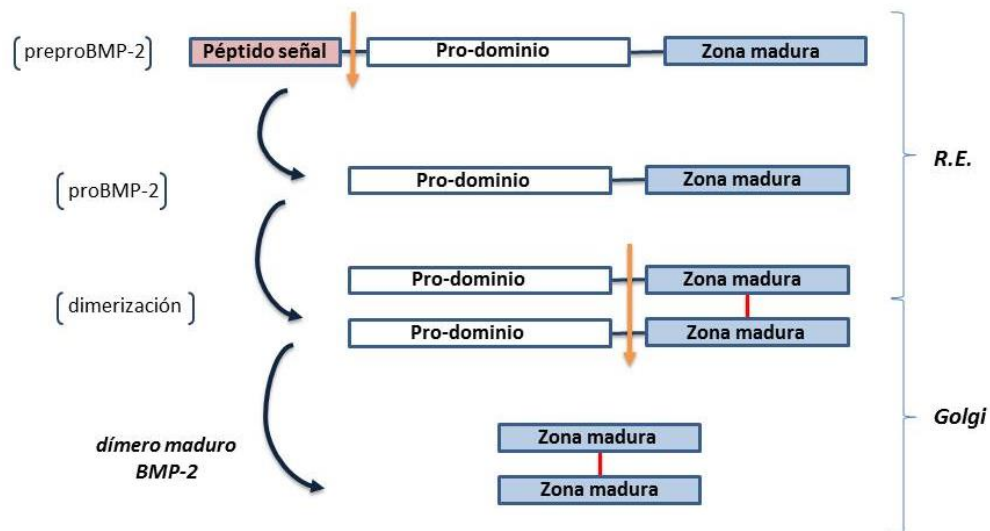


Figura 1.6: Secuencia de construcción del dímero maduro de BMP-2. Se genera una estructura inicial que consta de una péptido señal (N-terminal), un prodominio y una zona madura (C-terminal); así en el retículo endoplasmático (R.E.) se retira el péptido señal y se produce la formación del dímero. Luego en la zona trans del aparato de Golgi se realiza el clivaje de los prodominios. Traducido de (Zhou, 2008).

1.3.6 BMP en Regeneración Ósea y Usos Comerciales

En el campo de la regeneración ósea, para que pueda existir dicha regeneración, se habla de la combinación de tres elementos fundamentales: células de respuesta viables, matriz extracelular que proporcione un microambiente y sustancias reguladoras o moléculas señales insolubles, como los factores de crecimiento (Oporto, Fuentes, Álvarez, & Borie, 2008) (Vukicevic & Sampath, 2009) (Tressler *et al.*, 2011). El éxito de la combinación de estos elementos, que resulta en una buena regeneración ósea está estrechamente relacionada con tres conceptos: osteogénesis, correspondiente a la capacidad de un biomaterial sustituto de hueso de formar nuevo tejido óseo (Watering *et al.*, 2012); osteoinducción referente a la habilidad para inducir la diferenciación de osteoblastos (Wozney, 2002) (Watering *et al.*, 2012); y finalmente osteoconducción definido como la habilidad de un material para permitir la formación de hueso en su superficie, actuando como estructura tridimensional de soporte de tejido óseo (Wozney, 2002) (Watering *et al.*, 2012).

De acuerdo a las características mencionadas, el tratamiento por excelencia utilizado en la regeneración ósea denominado “gold standard” es el injerto autólogo o autoinjerto (obtención del injerto desde el mismo paciente a tratar (Oporto *et al.*, 2008)), ya que provee un ambiente osteoinductivo acoplado con células, así como también factores de crecimiento y diferenciación que pueden resultar en osteoinducción (Wozney, 2002). Además ya que se trata de injerto propio del paciente tratado, es uno de las únicas alternativas que entrega los tres conceptos claves, cumpliendo no sólo con la característica osteoinductora sino que incluye una buena osteogénesis y osteoconducción (Wozney, 2002). Sin embargo, la calidad y cantidad son limitadas y dependientes de cada paciente (Tressler *et al.*, 2011), lo que implica cuestionamientos sobre su real disponibilidad e incidencia asociada a su obtención (involucra una cirugía adicional) respecto a la tasa de éxito en la regeneración misma (Wozney, 2002). Cuestionamientos como el anterior han llevado al desarrollo de sustitutos ya sea osteoconductores como colágeno, cerámicas, polímeros, entre otros (Boden, 2002); osteoinductores como matriz ósea desmineralizada DBM (sigla en inglés para demineralized bone matrix) y *rhBMP* (donde ambos finalmente contienen BMP pero de distinta procedencia); o bien osteopromotor como plasma rico en plaquetas y médula ósea (McKay, Peckham, & Scifert, 2006).

Así, el descubrimiento y la producción de agentes osteoinductores ha provisto de la posibilidad de reemplazar la necesidad de un injerto autólogo por un producto de ingeniería de tejidos; además,

la habilidad de controlar la calidad, actividad y dosis de un agente osteoinductor puede proveer mayor seguridad en inducción y reparación de hueso (Wozney, 2002). Esto ha permitido que los cirujanos tengan la habilidad de controlar la osteogénesis a través de la aplicación local de BMP en sus pacientes (Vukicevic & Sampath, 2009), reportándose incluso menores tiempos de recuperación y menores pérdidas de sangre en operaciones (Tressler *et al.*, 2011), eliminando la necesidad de dos cirugías (McKay, Peckham, & Badura, 2007)

Desde las primeras pruebas clínicas con BMP, éstas han sido las primeras proteínas terapéuticas aprobadas para el uso de ingeniería de tejidos en conjunto con una matriz y aparatos fijadores biocompatibles en el área de medicina regenerativa (Vukicevic & Sampath, 2009). La BMP-2 fue aprobada para uso médico por la FDA el año 2002, vendida como Infuse® Bone Graft (EE.UU) o InductOs® (Reino Unido) de la compañía Medtronic Inc. Las aplicaciones reconocidas hoy por organismos como la FDA y equivalentes en países europeos es en cirugías de fusiones espinales o artrodesis lumbares anteriores (año 2002), tratamiento de fracturas abiertas en la tibia (año 2004); y finalmente procedimientos maxilofaciales como elevación del seno maxilas o aumento alveolar (año 2007) (McKay *et al.*, 2007). Por otro lado, la BMP-7 también fue incorporada al mercado, vendida como OP-1™ Putty y OP-1™ Implant por la empresa Stryker, quien vendió los derechos de este producto a la marca Olympus en 2011.

1.4 SISTEMAS BIOLÓGICOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La expresión de proteínas a partir de células nativas bajo condiciones fisiológicas, es generalmente baja y por tanto no permite una adecuada extracción y purificación, para generar las cantidades que se necesitan en ensayos de investigación y usos clínicos (Zhou, 2008). Es por esta razón que a través de la ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante, se aíslan genes determinados y se introduce en las células de un organismo distinto, confiriéndole a este último la capacidad de expresar la proteína (Barros, Hurtado, Altamirano, & Illanes, 2005).

La cantidad de proteína a producir, las modificaciones post-traduccionales requeridas, la presencia de endotoxinas, los costos asociados a los medios de cultivo y a los bio-reactores necesarios para su producción y problemas asociados por contaminación viral, son factores decisivos al momento de

seleccionar al hospedador para la producción de proteínas (Kelley, Chiou, Rosenberg, & Wang, 2004).

Dentro de los posibles sistemas biológicos de expresión de proteínas recombinantes, se encuentran las bacterias, levaduras, líneas celulares de insecto y líneas celulares mamíferas entre otras.

1.4.1 Sistemas de Expresión Bacterianos

Las bacterias utilizadas como sistemas de expresión, poseen altas tasas de crecimiento y logran normalmente altas concentraciones celulares, permitiendo generar grandes cantidades de proteínas (Pörtner, 2009). Sin embargo, carecen de la habilidad de modificar proteínas por lo que no pueden dimerizar, plegar correctamente, o glicosilar para generar formas funcionales de la proteína madura (Zhou, 2008).

Al no poseer la maquinaria biosintética para realizar estas modificaciones post-traduccionales, las proteínas resultantes presentan un patrón de plegamiento incorrecto y son más hidrofóbicas comparadas con su contraparte, la proteína nativa, lo que podría enmascarar epítomos de la proteína (Savage, 1997) o sitios de reconocimiento esenciales para su funcionalidad biológica produciendo finalmente grandes cantidades de proteína inactiva.

De modo que la forma no glicosilada de una glucoproteína, tiende a generar una proteína mal plegada, biológicamente inactiva o que se elimina rápidamente del organismo en el que circula (Zhang, 2010).

1.4.2 Sistemas de Expresión Eucariontes: Levaduras y Líneas Celulares de Insecto

Dentro de los sistemas eucariontes, se encuentran las levaduras que poseen una elevada productividad y una mayor velocidad de crecimiento en comparación a otras líneas celulares; además poseen la capacidad de generar ciertas modificaciones post-traduccionales en las proteínas, como cierto tipo de glicosilaciones, por lo que es el sistema eucarionte de preferencia para la producción de proteínas, siempre y cuando el producto final sea relativamente sencillo.

Las levaduras pueden realizar glicosilaciones sencillas, siendo capaces de añadir secuencias de Glc₃Man₉GlcNAc para N-glicosilaciones, pero no son capaces de procesar cadenas de oligosacáridos complejos, aunque si pueden añadir estructuras manosiladas que pueden contener hasta 50

moléculas de manosa. Las O-glicosilaciones que pueden generar las levaduras, corresponden a la unión de hasta 5 moléculas de manosas a la Ser/Thr, sin embargo no necesariamente a los mismos sitios que las O-glicosilaciones en células animales. Es por esto que se presentan dos problemas principalmente en la producción de glicoproteínas expresadas en levadura: primero está la probabilidad de que el tiempo de circulación se vea disminuido producto de la vía de despeje de los receptores de Man/GlcNAc del sistema retículo endotelial y segundo es la posible antigenicidad de las cadenas de oligomanosa (Savage, 1997).

Las líneas celulares de insecto también presentan problemas similares al momento de realizar las modificaciones post-traduccionales, ya que si bien poseen la capacidad de glicosilar proteínas, no presentan los mismos patrones de glicosilación que las células mamíferas, lo que deriva a una situación similar a la expuesta en el caso de levaduras (Zhou, 2008). Por esta razón las líneas celulares de insectos son utilizadas principalmente como vehículos para la formulación de vacunas virales en ingeniería genética usando baculovirus como sistema de expresión (Safdar & Cox, 2007).

1.4.3 Sistemas de Expresión Eucariontes: Líneas Celulares Mamíferas

Los cultivos de células mamíferas se han convertido en el sistema dominante para producción de proteínas recombinantes con aplicaciones clínicas, debido a su capacidad de generar un correcto patrón de plegamiento y modificaciones post-traduccionales, generando una proteína de eficacia y calidad superior comparada con las producidas en otros hospedadores o sistemas de expresión (Wurm, 2004).

Sin embargo, los cultivos de células mamíferas presentan ciertas desventajas comparados con los cultivos de microorganismos, presentando una baja velocidad de crecimiento, baja productividad, requerimientos de composiciones de medios de cultivos más complejos, baja resistencia a metabolitos tóxicos como el amonio y el ácido láctico, además de una alta sensibilidad a estímulos externos y alta susceptibilidad al estrés mecánico, ya que las células mamíferas están envueltas con una suave bicapa lipídica como membrana celular y no con una pared resistente como en el caso de las bacterias (Tokashiki & Yokoyama, 1997).

Desarrollo de líneas celulares mamíferas

Para establecer una línea celular, inicialmente se transfiere a la célula el gen recombinante con los elementos de regulación necesarios para su transcripción, junto a un segundo gen que confiera a la

célula receptora una ventaja de selección, los más usados son el gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) y la glutamina sintetasa (GS) (Wurm, 2004).

Existen diversos métodos físicos, químicos y biológicos para la transfección de estos genes, que se utilizan dependiendo del tipo de célula, las características de crecimiento, y del uso subsecuente de la célula manipulada (Schlokot, Himmelspace, Falkner, & Dorner, 1997). Estos métodos se pueden apreciar en la Figura 1.7.

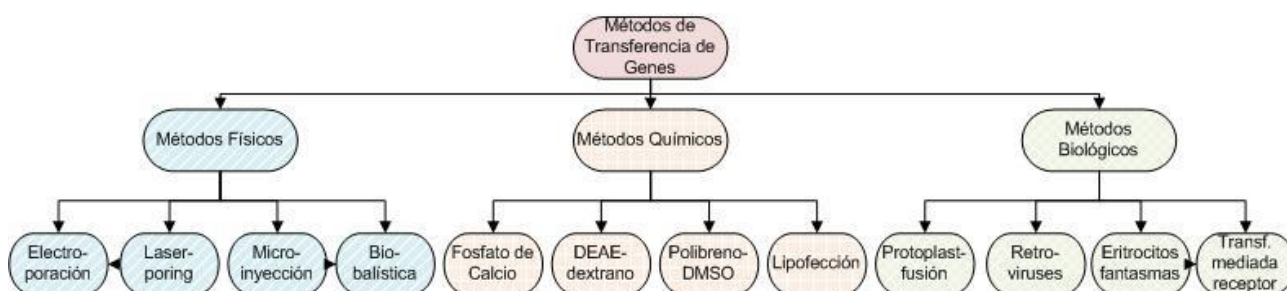


Figura 1.7: Métodos de transferencia de genes para introducir ADN exógeno en una célula. Imagen traducida de (Schlokot et al., 1997).

Posteriormente se generan subcultivos para permitir la expansión del cultivo o línea celular, dando la posibilidad de clonar, caracterizar, preservar y dar mayor uniformidad al cultivo (Becerra, Canessa, Altamirano, & Illanes, 2003); y luego de varios subcultivos las líneas celulares finitas mueren, mientras que aquellas que sobreviven es porque han adquirido la capacidad de crecer y multiplicarse un número ilimitado de generaciones estableciéndose como líneas celulares continuas (Lubiniecki & Petricciani, 2001), las que se utilizan para la etapa de producción. El proceso de selección de líneas celulares se esquematiza en la Figura 1.8.

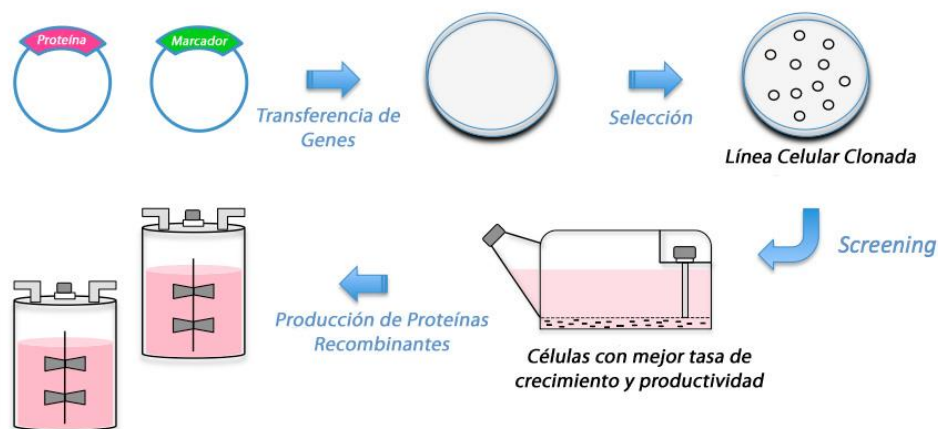


Figura 1.8: Establecimiento de línea celular para células mamíferas como sistemas de expresión. Imagen traducida de (Zhou, 2008). El gen que codifica la proteína de interés junto a un marcador de selección se transfieren a la célula receptora, aquellas células que sobrevivan al proceso de selección son cultivadas para producir una población de clones. Luego se evalúa su capacidad de expresión de la proteína, la que tenga una mayor tasa de crecimiento y productividad se selecciona para la producción de la proteína recombinante.

Las líneas celulares continuas se caracterizan por una alteración en la citomorfología (menor tamaño, menos adherentes, más redondas y mayor razón núcleo/citoplasma), un incremento en la velocidad de crecimiento (reduciendo el tiempo de duplicación de entre 36 y 48 horas a entre 12 y 36 horas), una reducción en la dependencia de suero animal, un incremento en la heteroploidia y aneuploidia y una mayor capacidad para formar tumores (Freshney, 2000).

Las ventajas de utilizar líneas celulares mamíferas continuas se evidencian en una mayor velocidad de crecimiento, obtención de mayores densidades celulares y rendimientos, menor requerimiento de suero animal y en algunos casos la capacidad de crecer en suspensión (Becerra *et al.*, 2003). Con respecto a esta última característica, cabe señalar que la mayoría de las líneas celulares establecidas presentan un crecimiento adherente a una superficie lo que dificulta el escalamiento del proceso, sin embargo, en el caso de las células CHO y las de riñón de hámster bebé (BHK) pueden adaptarse a crecer en suspensión, con lo que se vuelve necesario tener especial cuidado con los sistemas de agitación debido al efecto del esfuerzo de corte que produce sobre las células (Barros *et al.*, 2005).

Metabolismo de células animales

Aunque no forma parte de los objetivos de este trabajo mencionar en detalle los rasgos del metabolismo celular, es necesario hacer una pequeña referencia a los procesos metabólicos que realizan las células mamíferas para entender posteriormente sus requerimientos nutricionales, y así definir un medio de cultivo adecuado para su desarrollo.

Fuentes de carbono y energía

Las células animales necesitan una fuente de carbohidratos (normalmente glucosa) y del aminoácido glutamina para producir ATP y NADPH metabólicos, para luego utilizar esta energía en mantener el metabolismo celular y/o sintetizar productos particulares de interés (Wagner, 1997) (Altamirano, Berríos, Vergara, & Becerra, 2013).

La glucosa contribuye hasta el 45% de la energía metabólica durante la fase de crecimiento exponencial, y sólo el 3% y el 0,2% es metabolizado por el ciclo de las pentosas y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos respectivamente (Fitzpatrick, Jenkins, & Butler, 1993). El resto de la glucosa es convertida a lactato alcanzando altos rendimientos en líneas celulares establecidas que varían normalmente entre 1 y 2 mol/mol (Becerra *et al.*, 2003).

La glutamina normalmente representa entre el 30 y el 98% de la energía celular en líneas de células mamíferas continuas, que significa una porción mucho más alta que en las células normales inactivas, considerándolo como única fuente de energía (Fitzpatrick *et al.*, 1993).

Subproductos metabólicos

Producto del consumo de glucosa a través de la ruta glicolítica y posterior fermentación láctica, se acumula lactato como subproducto, mientras que el consumo de glutamina debido a la desaminación que sufre para ingresar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, genera altas concentraciones de amonio.

Tanto el lactato como el amonio pueden resultar tóxicos para el desarrollo del cultivo si se acumulan en concentraciones elevadas (Becerra *et al.*, 2003).

El lactato puede disminuir el pH del medio de forma severa al ser excretado por las células, sin embargo, puede evitarse manteniendo un adecuado control sobre este parámetro en valores entre

6,7 y 7,4 para un correcto crecimiento y formación de productos (Wagner, 1997). Sin embargo, el efecto inhibitorio en el crecimiento celular por parte del lactato, se debe al aumento en la osmolaridad del medio que provoca su acumulación (Kurano, Leist, Messi, Kurano, & Fiechter, 1990). Se ha evidenciado que hasta concentraciones de 20 mmol/l (1,8 g/l) no se produce ningún efecto negativo en las condiciones del cultivo (Wagner, 1997) por lo que manteniendo niveles bajos de glucosa se puede reducir la acumulación de ácido láctico y simultáneamente incrementar la respiración (Glacken, Fleischaker, & Sinskey, 1968).

El amonio puede formarse a partir de la degradación química dependiente de temperatura de glutamina a ácido pirrolidón carboxílico liberando amoníaco al medio (Tritsch & Moore, 1962), aunque la mayor parte proviene de dos pasos de la glutaminólisis y luego es secretado al medio (Wagner, 1997).

Productividad de los sistemas de células mamíferas

Es sabido que la densidad celular, la productividad y el rendimiento que alcanzan las líneas celulares mamíferas son inferiores a las que pudieran alcanzarse al trabajar con cultivos bacterianos o con levaduras; sin embargo, los avances tecnológicos y las investigaciones relacionadas al tema han permitido el desarrollo de conocimiento y prácticas que mejoran la proliferación de estos cultivos, así como también la producción de la proteína de interés.

Wurm, F. (2004) ha comparado datos hipotéticos de un proceso de producción en un “tanque agitado”, en el mejor de los casos en 1986 con un caso de producción industrial del 2004, en la que se muestran los avances mencionados.

En 1986 los cultivos de células mamíferas alcanzaban cerca de $2 \cdot 10^6$ células/ml en la fase de producción de un proceso por lotes de alrededor de 7 días y una productividad específica ligeramente menor a 10 pg/célula/día, el producto apenas alcanzaba los 50 mg/l. En el proceso industrial en el año 2004, el cultivo inició con una baja densidad de células cercana a 100.000 células/ml y rápidamente alcanzó una densidad de $10 \cdot 10^6$ células/ml, con una alta viabilidad celular que se mantuvo por casi 3 semanas, y un rendimiento acumulado de 4,7 g/l con una productividad específica que ascendía a los 90 pg/célula/día (Wurm, 2004).

1.4.4 Células de Ovario de Hámster Chino (Células CHO)

Los primeros en desarrollar una línea celular de células CHO fueron los investigadores Kao y Puck en 1968, creando así la línea celular CHO-K1 para estudiar la genética de las células somáticas.

En la actualidad estas células están muy bien caracterizadas, ya que ha sido estudiado su mapa genético, cariotipo, condiciones de cultivo y requerimientos nutricionales (Becerra *et al.*, 2003), que sumado a la capacidad de generar mutantes mediante tecnología de ADN recombinante, se vuelven muy útiles para la producción de proteínas terapéuticas a escala industrial.

Las ventajas de estas líneas celulares se resumen en la baja probabilidad de portar agentes víricos junto a las proteínas de interés, son capaces de crecer en medios de cultivos libres de suero sanguíneo (químicamente definidos), permitiendo eliminar la variación entre lotes, disminuyendo las probabilidades de contaminación o presencia de compuestos citotóxicos y facilitando los procesos de purificación, además de la posibilidad de utilizar técnicas de crecimiento en suspensión facilitando así el escalamiento industrial (Becerra *et al.*, 2003).

1.5 PRODUCCIÓN DE *rhBMP-2* EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO

La purificación de proteínas morfogenéticas óseas a partir de hueso crudo, es compleja y obtiene rendimientos muy bajos, a pesar de que se han descrito y patentado diversos procesos de extracción (Estados Unidos Patente nº 4.455.256, 1984), la producción de BMP-2 activa, en la actualidad se realiza en cultivos de líneas celulares mamíferas, obteniendo mayor productividad y rendimiento.

Las líneas celulares que más comúnmente se usan para la producción de *rhBMP-2*, son las de riñón de embrión humano (HEK 293) y las células CHO, las cuales secretan la proteína madura al medio de cultivo (Zhou, 2008). Actualmente las dos proteínas morfogenéticas óseas aprobadas para su uso terapéutico (*rhBMP-2* o InFuse® y *rhBMP-7* u OP-1®) son producidas en líneas celulares de CHO.

1.5.1 Requerimientos Nutricionales y Medios de Cultivo

Son muchas las investigaciones realizadas sobre la formulación de medios de cultivo para líneas celulares CHO, con el fin de eliminar la utilización de suero sanguíneo o fetal bovino, disminuir la acumulación de subproductos metabólicos que resulten tóxicos para el cultivo, y para entregar la

mejor combinación de nutrientes con el fin de aumentar la productividad y los rendimientos de la proteína de interés.

En 1955 Harry Eagle estudió la composición mínima de medio de cultivo para mantener la viabilidad de una línea celular, identificando 13 aminoácidos esenciales, 8 vitaminas, sales, minerales, entre otros.

Para el desarrollo de líneas celulares CHO, se especifican ciertos componentes determinantes en el crecimiento y en la producción de proteínas recombinantes, a continuación se mencionan los más destacados:

Glucosa

Es la fuente de carbono y energía más utilizada en el cultivo in vitro de células animales, sin embargo, como ya fue mencionado en la sección 1.4.3 no necesariamente representa la fuente que genera la mayor cantidad de energía. Las concentraciones que se usan normalmente van entre 5 y 25 mM, sin embargo la velocidad a la que ingresa la glucosa en la célula es mayor que su degradación por medio del ciclo de krebs, por lo que se refleja en un aumento de la fermentación láctica y por tanto, en la acumulación de Lactato (Becerra *et al.*, 2003).

La glucosa puede ser reemplazada por otras fuentes de carbono como galactosa, fructosa o manosa (Altamirano, Paredes, Cairó, & Gòdia, 2000).

Glutamina

Representa una fuente de carbono y energía de suma importancia y resulta esencial como precursor de la síntesis de proteínas y ribonucleótidos (van der Valk *et al.*, 2010). Usualmente se utiliza en concentraciones entre 1 y 5 mM (Becerra *et al.*, 2003).

Aminoácidos

Los 13 aminoácidos esenciales identificados por H. Eagle son necesarios para cultivar células mamíferas y corresponden a: arginina, cisteína, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina, y se mantienen en altas concentraciones (0,5-4 mM) en los medios de cultivos basales (parámetros referidos específicamente al medio DMEM) (van der Valk *et al.*, 2010).

Vitaminas

Por lo general, las vitaminas corresponden a precursores de coenzimas necesarias para las reacciones bioquímicas de la célula, si bien se utilizan en cantidades trazas son esenciales para el desarrollo celular (Alberts *et al.*, 2002). Estos compuestos están presentes en la formulación de medios basales definidos (van der Valk *et al.*, 2010).

Lípidos

Los lípidos sirven como reservas de energía, son componentes estructurales de la membrana celular y participan en los sistemas de transporte y señalización de la célula (van der Valk *et al.*, 2010). Son parte esencial de la ruta de N-glicosilación y se ha demostrado que aumentan la viabilidad celular (Jenkins, Castro, Menon, Ison, & Bull, 1994), por lo que su adición al medio de cultivo resulta clave, sobre todo si se trata de un medio libre de suero.

Suero animal

El uso de suero animal se justifica al momento de estandarizar una fórmula de medio de cultivo para desarrollar diversas líneas celulares, ya que contiene todas las moléculas complejas esenciales que se requieren en bajas cantidades como los factores de crecimiento, proteínas receptoras, hormonas, proteínas de transporte y muchas otras (Becerra *et al.*, 2003).

Sin embargo, las sustancias derivadas de animales pueden cargar contaminantes en el proceso y potencialmente en el producto final. Por lo que existen riesgos asociados a su uso, ya que pueden ser fuente de transmisión de priones, virus u otros agentes patógenos, por lo que las autoridades sanitarias cada vez son más estrictas al momento de validar un proceso, y actualmente cuando se trata de una proteína terapéutica se especifica que deben utilizarse alternativas que no contengan medios complejos animales para su uso, cuando sea posible (Zhang, 2010).

1.5.2 Modalidades de Cultivo

Existen diversas modalidades para cultivar líneas celulares mamíferas diferenciadas en dos grandes grupos; los cultivos por lotes y los cultivos continuos.

Dentro de los cultivos por lotes, encontramos dos modalidades; el cultivo por lote tradicional en el que se alimentan todos los nutrientes al inicio, se inocula el reactor con la línea celular y no se

interrumpe el cultivo hasta que finaliza, es decir, no se incorporan nutrientes nuevos, ni se extrae medio agotado. Esto produce la acumulación de compuestos citotóxicos derivados del propio metabolismo celular, generando que las densidades celulares alcanzadas no superen los $2 \cdot 10^6$ células/ml por lo que la concentración de producto final también es baja (Tokashiki & Yokoyama, 1997) (Wurm, 2004). Por otro lado está el cultivo por lotes alimentado, que al igual que en el cultivo anterior, no se extrae medio en ningún momento, sin embargo luego de cargar el reactor se alimentan nutrientes y medio fresco de forma continua o intermitente. Con esta modalidad, se logra mantener el cultivo por un periodo más prolongado ya que impide el agotamiento de nutrientes, sin embargo al no extraer medio del reactor, los compuestos citotóxicos se acumulan y las células mueren de todas formas, alcanzando concentraciones ligeramente mayores a los cultivos por lotes o incluso iguales.

Los cultivos continuos incluyen al quimiostato y al cultivo en perfusión; el quimiostato es un proceso donde el medio fresco es agregado continuamente al biorreactor que contiene las células, en la misma cantidad en que el medio agotado que contiene células es retirado. La alimentación se determina según la tasa de proliferación de las células, con el fin de que no ocurra un lavado del cultivo, sin embargo, resulta difícil tener un incremento suficiente en la densidad celular y la concentración del producto de interés, con lo que las ventajas de este cultivo continuo se ven reducidas (Tokashiki & Yokoyama, 1997).

El cultivo en perfusión consiste en alimentar medio fresco en la misma razón que el medio agotado es retirado, la diferencia con el quimiostato es que el medio agotado se encuentra libre de células. Esto permite alcanzar una mayor densidad celular que varía entre $1 \cdot 10^7$ y $1 \cdot 10^8$ células/ml, e incrementar la productividad de la proteína de interés por un período de tiempo mayor que en otros tipos de cultivo (Tokashiki & Yokoyama, 1997).

1.5.3 Mejoras y Optimizaciones para la Producción de *rhBMP-2*

Mejoras generales para el desarrollo del cultivo

Diversos estudios se han realizado con el fin de aumentar el rendimiento en cultivos de células mamíferas, aumentar su viabilidad o disminuir los desechos tóxicos productos del metabolismo celular, en función de eliminar la utilización de suero animal.

En primera instancia se desarrollan los métodos de cultivo en suspensión para facilitar los procesos de escalamiento, así como también la manipulación de las condiciones ambientales con el fin de aumentar la productividad de la proteína de interés, por ejemplo utilizar condiciones de hipotermia suave a 31°C para evaluar los rendimientos del cultivo (Vergara, Becerra, Díaz-Barrera, Berrios, & Altamirano, 2012), u otros estudios que apuntan a encontrar las condiciones óptimas para la producción de un cierto compuesto.

Una mejora importante como ya se ha mencionado es la eliminación de suero animal para lograr una composición de medio definido con el fin de facilitar los procesos de separación posterior y de validación del producto final ante organismos calificados. Ante esto se han llevado a cabo diversos estudios para realizar un medio definido en miras de minimizar y eliminar su utilización (van der Valk *et al.*, 2010).

Al generar un medio definido es necesario incorporar una fuente de carbono y energía, que como ya se dicho, se prefieren glucosa y glutamina como compuestos para cumplir esta función.

La utilización de glucosa y glutamina generan desechos metabólicos citotóxicos por lo que se ha vuelto necesario controlar de alguna forma su alimentación con el fin de disminuir las concentraciones de lactato y amonio, con lo que se han propuesto diversos métodos como la alimentación estequiométrica (Zhang, 2010), el reemplazo de glucosa por otros carbohidratos como galactosa, fructosa o manosa, con el fin de retrasar la formación de lactato (Altamirano *et al.*, 2000), el reemplazo de glutamina por glutamato para disminuir las concentraciones de amonio (Altamirano *et al.*, 2001), o combinar ambas opciones en la que utilizando una mezcla de glutamato y galactosa se han obtenido buenos resultados en la expresión de una proteína determinada (Altamirano *et al.*, 2000).

Mejoras específicas para la producción de *rhBMP-2*

Aparte de todos los estudios realizados para aumentar la viabilidad y productividad en cultivos de células CHO, se han identificado algunos métodos para la aumentar la productividad de la proteína *rhBMP-2* en especial.

Un mecanismo hace referencia a la inhibición o alteración del clivaje del pro-dominio de la proteína con el fin de aumentar la cantidad de proteína recombinante secretada de la célula eucarionte (Peel, Clokie, & Turner, 2010) haciendo uso por ejemplo de péptidos específicos como el 9DR (Zhou, 2008).

Además se han publicado mejoras en los medios de cultivo que aumentan la productividad como es el caso de mantener una concentración de hierro de al menos 2,25 μM y si hay piridoxal presente debe ser menos del 55% de la concentración de vitamina B6 en el medio (Estados Unidos Patente nº US 8,039,231 B2, 2011).

1.5.4 Apoptosis y Muerte Celular

Si bien la muerte celular no es un tema a desarrollar en este trabajo, es necesario mencionar que existen dos formas habituales para este fenómeno: necrosis y apoptosis.

Cuando se generan condiciones extremas en un cultivo celular, como por ejemplo un aumento brusco en la temperatura o en el pH, las células no pueden mantener una homeostasis adecuada con el medio y se induce el rompimiento celular vaciando su contenido al medio; proceso conocido como necrosis.

Por otro lado, en la apoptosis o muerte celular programada, la misma célula posee incorporado en su genoma la capacidad de cometer suicidio, según las señales que reciba de su entorno (Alberts *et al.*, 2002); estas señales pueden originarse en la misma célula o bien de la interacción con células vecinas. (Pontificia Universidad Católica de Chile, 2013). El proceso de muerte consiste en la condensación del núcleo, provocando que la célula se seque para que el cuerpo marchito sea absorbido y digerido por sus células vecinas (Alberts *et al.*, 2002).

Es por esto que se vuelve necesario cuidar las condiciones del cultivo, ya que se podrían generar señales en cascada que provocarían la muerte celular del cultivo, llevando a la pérdida de la viabilidad celular de forma irreversible significando serias consecuencias económicas.

1.6 OBJETIVOS

Una vez detallado el contexto y los antecedentes necesarios para comprender el proyecto, se procede a establecer los objetivos que motivan y guían este trabajo.

1.6.1 Objetivo General

Evaluar la factibilidad técnico-económica de una planta productora de *rhBMP-2* producida en células CHO.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Establecer el estado del arte de la proteína *rhBMP-2*.
- Establecer el mercado de la proteína *rhBMP-2* y definir volúmenes de producción.
- Seleccionar el proceso de producción, desarrollar el diseño de equipos y ubicación para el montaje de la planta.
- Evaluar la rentabilidad del proyecto.

1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1

- Ailor, E., & Betenbaugh, M. (1999). Modifying secretion and post-translational processing insect cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 142 - 145.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (2002). *Biología Molecular de la Célula* (Tercera Edición ed.). Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walters, P. (2004). Glosario. En B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walters, *Biología Molecular de la Célula* (págs. G:1 - G:50). Ediciones Omega.
- Altamirano, C., Berríos, J., Vergara, M., & Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 1 - 17.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablanco, A., Gámez, X., Cairó, J., & Gòdia, C. (2001). Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17, 1032-1041.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J., & Gòdia, F. (2000). Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. *Biotechnology Progress*, 16, 69-75.
- Barros, I., Hurtado, I., Altamirano, C., & Illanes, A. (2005). *Estudio de Factibilidad Técnico-Económica para la instalación de una planta productora de Eritropoyetina recombinante*. Tesis, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso.
- Becerra, S., Canessa, R., Altamirano, C., & Illanes, A. (2003). *Generación de protocolos y puestas en marcha del laboratorio de cultivo de células animales de la Escuela de Ingeniería Bioquímica*. Tesis, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso.
- Boden, S. (2002). Overview of the Biology of Lumbar Spine Fusion and Principles for Selecting a Bone Graft Substitute. *SPINE*, 27(16S), S26 - S31.
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J., & E. Vázquez, A. V. (2009). Review: Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8(17).

- Fitzpatrick, L., Jenkins, H., & Butler, M. (April de 1993). Glucose and Glutamine Metabolism of a Murine B-Lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43, 93-116.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York, United States: Wiley-Liss.
- Garrison, K., I. Shemilt, S. D., Ryder, J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., & Alt, V. (2010). Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults (Review). (6), 2, 157. (T. C. Library, Recopilador) The Cochrane Collaboration.
- Glacken, M., Fleischaker, R., & Sinskey, A. (1968). Reduction of Waste Product Excretion via Nutrient Control: Possible Strategies for Maximizing Product and Cell Yields on Serum in Culture of Mammalian Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1376-1389.
- Hogan, B. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*, 10, 1580 - 1594.
- Jayapal, K., Wlaschin, K., Hu, W.-S., & Yap, M. (2007). Recombinant Protein Therapeutics form CHO Cells: 20 Years and Counting. *CHO Consortium: SBE SPecial Section*, 40 - 47.
- Jenkins, N., Castro, P., Menon, S., Ison, A., & Bull, A. (1994). Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells. *Cytotechnology*, 15, 209-215.
- Kelley, B., Chiou, T.-W., Rosenberg, M., & Wang, D. (2004). Industrial Animal Cell Culture. En M. Beyer, B. M.M., P. S. Cheetham, A. Chenchik, M. Dutta, N. N. Dutta, . . . T. Madhusudhan, *New trends and developments in biochemical engineering*. Berlín, Alemania: Springer.
- Kim, S., Lee, E., Cho, T., Song, Y., Hwang, S., Oh, J., . . . Seo, Y.-K. (2011). Promising Efficacy of Escherichia coli Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Collagen Sponge for Ectopic and Orthotopic Bone Formation and Comparison with Mammalian Cell Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue engineering*, 17(3 and 4), 337 - 348.
- Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S., & Fiechter, A. (July de 1990). Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *Journal of Biotechnology*, 15(1-2), 113-128.

- Laub, M., Seul, T., Schmachtenberg, E., & Jennissen, H. (2001). Molecular Modelling of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) by 3D-Rapid Prototyping. *Mat.-wiss- u. Werkstofftech.*, 926 - 930.
- Luan, Y.-T., Wang, W., Nyberg, G., Gomes, J. M., Drapeau, D., & Cardoza, T. (2011). *Estados Unidos Patente nº US 8,039,231 B2*.
- Lubinieccki, A., & Petricciani, J. (2001). Recent trends in cell substrate considerations for continuous cell lines. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 317-319.
- Mardegan, J., Nascimento, C. d., Santos, R. d., Silva, A. d., & Mizusaki, M. (2006). Morphogenetic Protein rhBMP-2 and New Bone Formation. *Int. J. Morphol.*, 24(3), 323 - 330.
- Matthews, S. (2005). Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMP's). *Injury, Int. J. Care Injured*(36S), S34 - S37.
- McKay, B., Peckham, S., & Scifert, J. (2006). Biologics to Promote Spinal Fusion. En S. M. Kurtz, & A. A. Edidin, *Spine Technology Handbook* (págs. 241 - 279). Elsevier Inc.
- McKay, W., Peckham, S., & Badura, J. (2007). A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *International Orthopaedics*(31), 729 - 734.
- Melmer, G. (2005). Biopharmaceuticals and the Industrial Environment. En G. Gellissen, *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems* (págs. 361 - 383). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Oporto, G., Fuentes, R., Álvarez, H., & Borie, E. (2008). Recuperación de la Morfología y Fisiología Maxilo Mandibular: Biomateriales en Regeneración Ósea. *Int. J. Morphol.*, 26(4), 853 - 859.
- Palomares, L., Estrada-Mondaca, S., & Ramírez, O. (2004). Production of Recombinant Proteins: Challenge and Solutions. En P. Balbás, & A. Lorence, *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* (págs. 15 - 51). Totowa: Humana Press Inc.
- Peel, S. A., Clokie, C. M., & Turner, J. D. (2010). *United States Patente nº US 2010/0087625 A1*.

Pontificia Universidad Católica de Chile. (Junio de 2013). *Manual de Patología General*. Obtenido de sitio Web Escuela de Medicina UC: http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_033.html

Pörtner, R. (2009). Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation. En R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano, & P. Czermak, *Cell and Tissue Reaction Engineering* (págs. 13-53). Berlin: Springer.

Safdar, A., & Cox, M. M. (2007). Baculovirus-expressed influenza vaccine: a novel technology for safe and expeditious vaccine production for human use. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(7), 927-934.

Sampath, T., Coughlin, J., Whetstone, R., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R., . . . Rueger, D. (1990). Bovine Osteogenic Protein is Composed of Dimers of OP-1 and BMP-2A, Two Members of the Transforming Growth Factor-beta Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 13198 - 13205.

Savage, A. (1997). Glycosilation: A Post-Translational Modification. En H. Hauser, & R. Wagner, *Mammalian cell biotechnology in protein production*. New York, United States: Walter de Gruyter.

Schlokot, U., Himmelsbach, M., Falkner, F. G., & Dorner, F. (1997). Permanent Gene Expression in Mammalian Cells: Gene Transfer and Selection. En H. Hauser, & W. Roland, *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production* (págs. 33-63). New York, United States: Walter de Gruyter.

Scott, M. (2009). Chapter 31: Recombinant proteins ind diagnosis and therapy. En M. Murphy, & D. Pamphilon, *Practical Transfusion Medicine* (págs. 347 - 354). Blackwell Publishing Ltd.

Sieber, C., Schwaerzer, G., & Knaus, P. (2009). Bone morphogenetic protein signaling is fine-tuned on multiple levels. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphigenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics* (págs. 81 - 114). Birkhäuser.

Suk, M. (2009). Use of recombinant human BMP-2 in orthopedic trauma. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphogenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics* (págs. 25 - 42). Birkhäuser.

Sykaras, N., & Opperman, L. (2003). Bone morphogenetic proteins (BMP): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*, 45(2), 57 - 73.

- Tokashiki, M., & Yokoyama, S. (1997). Bioreactors Designed for Animal Cells. En H. Hauser, & R. Wagner, *Mammalian cell biotechnology in protein production*. New York, United States: Walter de Gruyter.
- Tressler, M., Richards, J., Sofianos, D., Comrie, F., Kregor, P., & Obrebsky, W. (2011). Bone Morphogenetic Protein-2 Compared to Autologous Iliac Crest Bone Graft in the Treatment of Long Bone Nonunion. *Orthopedics*, 34(12), e877 - e884.
- Tritsch, G., & Moore, G. (1962). Spontaneous Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media. *Experimental Cell Research*, 28, 360-364.
- Urist, M. (1965). Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 150(3698), 893 - 899.
- Urist, M. (1984). *Estados Unidos Patente nº 4.455.256*.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L., . . . Gstraunthaler, G. (Marzo de 2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24, 1053-1063.
- Vergara, M., Becerra, S., Díaz-Barrera, Á., Berrios, J., & Altamirano, C. (Noviembre de 2012). Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(6), 1-9.
- Vukicevic, S., & Sampath, K. (2009). Introduction. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics* (págs. 1 - 6). Birkhäuser.
- Wagner, R. (1997). Metabolic Control of Animal Cell Culture Processes. En H. Hauser, & R. Wagner, *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production* (págs. 193-232). New York, United States: Walter de Gruyter.
- Wang, X., Schröder, H., Wiens, M., Ushijima, H., & Müller, W. (2012). Bio-silica and biopolyphosphate: applications in biomedicine (bone formation). *Current Opinion in Biotechnology*, 570 - 578.
- Watering, F. v., Beucken, J. v., Woning, S. v., Briest, A., Eek, A., H. Qureshi, . . . Jansen, J. (2012). Non-glycosylated BMP-2 can induce ectopic bone formation at lower concentration compared to glycosylated BMP-2. *Journal of Controlled Release*(159), 69 - 77.

- White, J. (10 de July de 2010). The Buisness of Recombinant Protein Production. *Drug: Discovery & Development*. Raleigh, North Carolina, USA.
- Wozney, J. (1992). The Bone Morphogenetic Protein Family and Osteogenesis. *Molecular Reproduction and Development*(32), 160 - 167.
- Wozney, J. (2002). Overview of Bone Morphogenetic Proteins. *SPINE*, 27(16S), S2 - S8.
- Wurm, F. (Noviembre de 2004). Production of Recombinant Protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
- Xiao, Y., Xiang, L., & Shao, J. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(362), 550 - 553.
- Zhang, J. (2010). Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production. En R. Baltz, J. Davies, & A. Demain, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Third Edition ed., págs. 157-178). Washington, United States: American Society of Microbiology.
- Zhou, J. J. (2008). *Enhancing Production of Recombinant BMP-2 In Mammalian Cell Culture Systems By Inhibition of Pro-protein Cleavage Using 9DR Peptides*. Thesis, University of Toronto, Faculty of Dentistry, Toronto.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA

En este capítulo se analizarán la oferta y los productos que compiten para resolver el mismo tipo de problemas que la proteína recombinante humana BMP-2; y la posible demanda de proteína *rhBMP-2* en Chile y otros países sudamericanos de acuerdo a las necesidades médicas en cada país. Así, este estudio de mercado determinará un tamaño de mercado aproximado, permitiendo definir si resulta conveniente, desde esa perspectiva, instalar una planta productora de *rhBMP-2* para finalmente establecer una cantidad de proteína a producir y por ende la capacidad de la planta.

2.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO Y BIOGENÉRICOS EN CHILE

Antes de proceder con el análisis de mercado, es necesario comprender en qué consiste el producto de interés y el contexto en el que se desarrollará.

La Organización Mundial de Salud define ingrediente farmacológico activo (API en inglés) como cualquier sustancia o combinación de sustancias utilizadas en un producto farmacéutico finalizado (FPP), destinado a proporcionar actividad farmacológica o de otro modo tener un efecto directo en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedad, o a tener un efecto directo en restaurar, corregir o modificar funciones fisiológicas en seres humanos (World Health Organization [WHO], 2011).

El producto de este proyecto de ingeniería consta en una presentación liofilizada de la proteína recombinante humana BMP-2 (*rhBMP-2*), cuya característica principal radica en la capacidad de regenerar hueso al inducir la formación de osteoblastos (ver Capítulo 1). Esta proteína, tal como se ha mencionado, ha sido autorizada por la FDA para su uso exclusivo en adultos, en procedimientos de artrodesis lumbares anteriores, más conocidas como fusiones lumbares anteriores (ALIF por su sigla en inglés) (Food and Drug Administration [FDA], 2002); en el tratamiento de fracturas tibiales abiertas (OTF por su sigla en inglés) (FDA, 2004); y finalmente en elevaciones del seno maxilar y aumentos alveolares en procedimientos de implantes dentales (FDA, 2007); la dosis utilizada en cada aplicación

depende del área que se pretende abarcar; se utilizan esponjas de colágeno las cuales se saturan en una solución acuosa con una concentración de 1,5 mg de *rhBMP-2* por ml de agua destilada. Cada una de estas aplicaciones será analizada por separado más adelante para determinar la demanda. Continuando con las particularidades del producto, cabe destacar que al tratarse de osteoinductores, las *rhBMP-2* pueden ser utilizadas como tratamiento principal o bien como un complemento a otro tipo de tratamientos, ya sea tradicional o novedoso como lo es la utilización de células madres. Esto, debido a que de cualquier forma se producirá una aceleración de la osteogénesis a través de la diferenciación de osteoblastos al añadir proteína en dosis adecuadas. De esta forma, este producto permite una versatilidad en su uso y proporciona cualidades que son irremplazables, pudiendo incluso utilizarlo como elemento principal en un tratamiento o bien de forma secundaria, pero siempre dando un uso y no siendo completamente reemplazado por nuevas tecnologías.

Por otro lado, para entender el contexto de los fármacos genéricos, en Chile desde 1991 la Ley 19.039 de Propiedad Industrial concede protección por medio de patentes de invención a medicamentos de toda especie, preparaciones farmacéuticas medicinales y reacciones químicas; y según el Artículo 40 concede usufructo por un período no renovable de 15 años o por los años de protección restantes en el país desde el que se solicitó la patente originalmente, siempre que no excedan los 15 años permitidos en Chile (Ley 19.039, 1991). De acuerdo a lo anterior, se habla de un producto genérico una vez caducada la patente (luego de 15 años) del medicamento y/o fármaco. En cuanto a la definición de biogénico o biofármaco genérico, se refiere a aquel biofármaco (producto farmacéutico de base biotecnológica) (Narváez, 2009) cuya patente haya expirado.

Respecto al producto de interés en este proyecto, las patentes más nuevas que reclaman la producción de BMP datan del año 1997, por lo que ya habrían caducado el año 2012 (Estados Unidos, Patente nº 5.618.924, 1997) (Estados Unidos, Patente nº 5.631.142, 1997). Sin embargo, la patente encontrada más poderosa en cuanto a restricción de la aplicación está registrada en EE.UU. y corresponde a la empresa de tecnología médica Medtronic Inc. (Estados Unidos, Patente nº US 2007/0142916 A1, 2007); en ella se protege principalmente el dispositivo de titanio (para casos de ALIF) y la matriz de colágeno en la que se mantiene la proteína, que hasta hoy resulta ser óptima debido a que se ha mostrado que este material permite liberar BMP de forma paulatina y en dosis moderadas (Garrison *et al.*, 2010), aumentando así la duración de la proteína del injerto en el cuerpo. Esta patente data del año 2007 y debería caducar entonces el año 2022. Actualmente el producto de este proyecto se podría considerar genérico, pero su aplicación está condicionada a un “carrier” o matriz (protegido por patente); sin

embargo, el desarrollo de una nueva matriz que no esté patentada no corresponde al objetivo de este trabajo. A su vez, al tratarse de un producto obtenido a través de un proceso biotecnológico, se aplicará la categoría de biofármaco genérico.

Ahora bien, antes de comenzar con el análisis de la oferta y demanda, es importante considerar que al tratar el mercado de medicamentos, se observan tres submercados: primero, medicamentos de venta libre (OTC por su sigla en inglés) que son comprados directamente por los pacientes; segundo, medicamentos éticos o de venta bajo receta médica con o sin archivar; y por último los medicamentos de internación, aquellos que son adquiridos por hospitales y consultorios (Vassallo, 2010). De esta forma y dadas las aplicaciones aprobadas para el uso de *rhBMP-2*, se considera que el producto de este trabajo correspondería a un medicamento de internación.

Por otra parte, a partir de un estudio realizado a solicitud de la Dirección de Economía de la Salud del Ministerio de Salud (MINSAL) de Chile, para este análisis de mercado se destacan 2 características, dentro de muchas, correspondientes al mercado de los medicamentos en Chile: (i) reducido número de competidores (laboratorios) en el mercado y (ii) existencia de barreras de entrada a la venta minorista de medicamentos (Vassallo, 2010). Esto muestra el contexto general bajo el que se trabajará y evaluará el mercado nacional, al tratarse de una oferta bastante pequeña, poco flexible y difícil de ampliar; pero tal vez no por ello cerrada totalmente a la incorporación de productos innovadores y de manufactura nacional.

2.2 ANÁLISIS OFERTA

Para el análisis de la oferta se presentarán y analizarán los antecedentes referentes al contexto nacional en lo que respecta la producción de fármacos. Luego se tratará el mercado competidor analizando el tratamiento tradicional aplicado a cada uno de los procedimientos, en los que también se autoriza la aplicación de *rhBMP-2*, correspondiente a injerto autólogo; y se revisarán con más detalle dos productos biotecnológicos distintos, pero con aplicaciones médicas similares entre sí, autorizados por la FDA: InFuse® y OP-1™.

2.2.1 Contexto Nacional

En Chile, como ya se ha mencionado, el universo productor de medicamentos es bastante pequeño; tal es el caso que aun cuando los laboratorios farmacéuticos nacionales se dedican principalmente a la fabricación de productos genéricos (Narváez, 2009), se ha manifestado que el desarrollo en general del mercado de genéricos es muy bajo, atribuyéndole tal fenómeno a razones que van desde la escasa convicción de políticas públicas hasta la dinámica que anima la lógica de la producción privada (Vassallo, 2010). A nivel latinoamericano, los mayores productores y líderes en el mercado son Brasil y Argentina (ver Tabla 2.1), teniendo una producción a escalas internacionales que ha llevado a la instalación de las principales compañías multinacionales en estos países; mientras que Chile sólo ha desarrollado un sector privado que atiende al mercado local, sin poder internacionalizar su producción (Vassallo, 2010).

Tabla 2.1: Mercado farmacéutico Latinoamericano. (Vassallo, 2010).

País	Ventas (US\$ MM)	Participación en el mercado regional (%)
Brasil	14.673	36,6
México	10.131	25,2
Venezuela	5.029	12,5
Argentina	3.733	9,3
Colombia	1.752	4,4
Centroamérica	1.278	3,2
Chile	1.060	2,6
Ecuador	787	2,0
Perú	726	1,8
República Dominicana	369	0,9
Uruguay	260	0,6
Paraguay	196	0,5
Bolivia	148	0,4

Dirigiendo lo anterior específicamente a la producción de biofármacos, se ha establecido que ninguno de estos fármacos utilizados en Chile es producido en este país, sino que son importados en su totalidad (Narváez, 2009); no habiendo modificaciones considerables de esa condición hasta el día de hoy. Por lo que si desde ya el mercado chileno es pequeño y deficitario en cuanto a fármacos genéricos de producción nacional, en el aspecto de los biogenéricos es definitivamente nulo. Así, resulta interesante analizar la posibilidad de producir en este país un biofármaco genérico como lo es *rhBMP-2*.

Dado que no existe producción nacional de *rhBMP-2*, la empresa que ofrece este producto en el país es la empresa estadounidense Medtronic Inc., antes mencionada, a través de una empresa nacional de comercialización de equipos médicos Importadora Helico Ltda. Esta empresa, junto con los demás posibles competidores del producto de interés, será detallada y analizada más adelante. Sin embargo, el precio al que se vende este producto, mencionado más adelante, es demasiado elevado como para que los pacientes chilenos puedan costearlo de forma adicional al ya alto valor de las cirugías y tratamientos en los que se aplica. Esto mismo fue mencionado por la mayoría de los especialistas con los que se contactó para realizar este trabajo; aun cuando uno mencionó efectos adversos presentados por la proteína, la mayoría mencionó que sí utilizarían el producto, pero el valor al que se comercializa en Chile es tan elevado, que pocos pacientes acceden a correr con los gastos.

2.2.2 Mercado Competidor

Injerto autólogo

Para el análisis del mercado competidor es importante destacar que el tratamiento utilizado por excelencia para la regeneración ósea es el injerto autólogo o autoinjerto (Wozney, 2002) (McKay, Peckham, & Scifert, 2006) (Garrison *et al.*, 2007). Sin embargo, debido a que el número de este tipo de procedimiento se desconoce, pues está asociado a una tasa de intervenciones quirúrgicas específica de la que no existe un registro detallado a nivel nacional, tratándose de datos reservados de las distintas clínicas y hospitales, es que se analizará este tratamiento competidor de forma más bien cualitativa. Así para determinar qué tan amplio es el uso de este tipo de injerto, se deberá asociar al análisis de la demanda, desarrollado más adelante, ya que el autoinjerto se obtiene únicamente y de preferencia cuando se requiere para un tratamiento de regeneración.

Por otro lado, es importante destacar que, para la mayoría de las aplicaciones, este tipo de injerto es obtenido desde la cresta ilíaca del paciente (ICBG). Y la razón de por qué se incluye como competidor, es debido a que el procedimiento en general presenta varias complicaciones, aun cuando es el “gold standard” de la regeneración ósea, que llevaron a considerar y desarrollar nuevas opciones de injerto, como por ejemplo *rhBMP-2* inserta en una matriz osteoconductora. Así el producto *rhBMP-2* ha sido creado para reemplazar el autoinjerto en ciertos casos (tres casos ya especificados), apuntando entonces al mismo mercado.

Las principales complicaciones y/o desventajas que presenta el autoinjerto es en primer lugar, que requiere de una cirugía adicional para la extracción, creando un segundo lugar quirúrgico, aumentando el tiempo operacional y la pérdida de sangre (Tressler *et al.*, 2011). Por otro lado, existe una cantidad límite de hueso disponible a extraer y a veces puede no ser suficiente (Garrison *et al.*, 2010). Así mismo se suman a la cantidad y calidad limitadas del injerto, otros problemas como dolores post-operatorios, infecciones y posibles fracturas en el lugar de extracción del injerto (McKay *et al.*, 2006). Es por estas razones que se ha llevado a la comercialización de varios sustitutos óseos, con el fin de evitar aquellos malestares en el paciente; dentro de los que se encuentra la *rhBMP-2* con muy buenos resultados. Por ejemplo en tratamientos de fracturas de huesos largos, se ha observado que la incidencia de infecciones post-operativas con autoinjerto de cresta ilíaca es de 16,2%, mientras que esa misma cifra se reduce a 5,3% en el caso de injerto de *rhBMP-2* con matriz esponjosa de colágeno absorbible (ACS) (Tressler *et al.*, 2011). Respecto a los tiempos de cirugía y pérdida de sangre intraoperacional, el injerto autólogo se asocia a aproximadamente 260 minutos (pues implica dos cirugías) y 555 ml respectivamente; en contraste, un tratamiento con *rhBMP-2* registra cifras de aproximadamente 87 minutos y 332 ml (Tressler *et al.*, 2011). En el caso de las artrodesis lumbares anteriores, un estudio que se sigue referenciando en trabajos actuales (Garrison *et al.*, 2010) muestra que las diferencias entre ambos tratamientos respecto a los tiempos de cirugía y los días de hospitalización no son tan notorias; sin embargo al tratarse de la pérdida de sangre, los valores entre injerto autólogo y proteína recombinante casi se duplican (Burkus, Transfeldt, Kitchel, Watkins, & Balderston, 2002). Lo anterior se relaciona además con que se ha observado que al tratarse con *rhBMP-2*, las personas pueden regresar con anterioridad al trabajo e incluso aumenta la cantidad de personas que luego de la operación puede continuar con su trabajo, a diferencia de aquellos a quienes se les implanta un autoinjerto (Burkus *et al.*, 2002).

De esta forma, las proteínas recombinantes humanas BMP-2 han ido estableciéndose de a poco en el mercado de lo que antes convencionalmente y por excelencia correspondía al autoinjerto, y en menor grado a injertos de otro tipo como aloinjertos (biomaterial de humanos procesado), sustitutos óseos sintéticos (aloplásticos) y otro tipo de biomateriales procesados a partir de especies no humanas (xenoinjertos).

Matriz ósea desmineralizada (DBM)

Otro caso es el de las matrices óseas desmineralizadas o DBM, un aloinjerto correspondiente a hueso cuyo material mineral es retirado por medio de un proceso con ácido, dejando como producto principalmente colágeno y pequeñas cantidades de BMP (McKay *et al.*, 2006). Sin embargo la cantidad de BMP presente en 1 kg de DBM es sólo del orden de nanogramos, por lo que se considera más como extensor o potenciador del autoinjerto (como complemento) (McKay *et al.*, 2006), cuando las dosis por lo general son el orden de miligramos de proteína. De esta forma, sí es importante mencionar este producto, pues es una de las opciones en el mercado que se considera como portador de BMP, por ende material osteoinductor; pero no lo suficiente como para llegar a competir con las características que ofrecen las *rhBMP-2* y lo que podrían generar si el precio de estas proteínas recombinantes fuera más accesible.

Por el contrario, las BMP producidas de forma recombinante sí están posicionadas dentro de las opciones de materiales sustitutos, como un reemplazo del autoinjerto (ver Tabla 2.2) (McKay *et al.*, 2006).

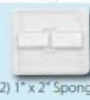
Tabla 2.2: Uso de sustitutos de injerto óseo. Traducido de (McKay *et al.*, 2006).

Material	Reemplazo de autoinjerto	Extensor de autoinjerto
Osteoinductor		
Proteína morfogenética ósea (BMP)	X	
Aloinjerto hueso desmineralizado (DBM)		X
Osteoconductor		
Cerámicas		X
Composit de cerámicas/colágeno		X
Osteopromotor		
Plasma rico en plaquetas (PRP)		X
Médula ósea		X

InFuse® Bone Graft

InFuse® Bone Graft es el nombre comercial con el que Medtronic Inc. (EE.UU) vende un kit que contiene una preparación liofilizada de proteína *rhBMP-2* (producida en línea celular CHO) con los correspondientes excipientes, una esponja de colágeno absorbible (ACS) (capaz de entregar concentraciones de 1,5 mg/ml de BMP) y la respectiva solución estéril para diluir la proteína a la concentración requerida (ver Figura 2.1) (Burkus *et al.*, 2002). Si bien el producto es vendido por la empresa Medtronic Inc., el compuesto activo, es decir, la *rhBMP-2* no es producida por esta empresa, sino que es suministrada por Wyeth Biopharma (O'Reilly, 2011) (que desde 2009 pertenece a la corporación farmacéutica multinacional Pfizer). Por otro lado Wyeth es el encargado de proveer en el Reino Unido y otros países de Europa este producto bajo el nombre de InductOs® desde 2005, siendo aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para su uso como sustituto del injerto autógeno en fusiones espinales en adultos (Alt *et al.*, 2009).

INFUSE® Bone Graft – Kit Components

Part Number/ Size	7510050 XX Small Kit	7510100 X Small Kit	7510200 Small Kit	7510400 Medium Kit	7510600 Large Kit	7510800 Large II Kit
INFUSE® Bone Graft Kit						
Total Graft Volume	0.7cc	1.4cc	2.8cc	5.6cc	8.0cc	8.0cc
Total mg rhBMP-2	1.05mg	2.1mg	4.2mg	8.4mg	12.0mg	12.0mg
Sterile Water for Injection	 (1) 5mL Vial	 (2) 5mL Vials	 (1) 5mL Vial	 (2) 5mL Vials	 (1) 10mL Vial	 (1) 10mL Vial
Sterile rhBMP-2	 (1) 1.05mg Vial	 (2) 1.05mg Vials	 (1) 4.2mg Vial	 (2) 4.2mg Vials	 (1) 12mg Vial	 (1) 12mg Vial
Sterile Absorbable Collagen Sponge (ACS)	 (1) 1/2" x 2" Sponge	 (1) 1" x 2" Sponge	 (2) 1" x 2" Sponges	 (4) 1" x 2" Sponges	 (6) 1" x 2" Sponges	 (1) 3" x 4" Sponge
PMA Approved Indication	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Dental	Spine* Trauma Dental

*Must be used with a Medtronic Titanium Threaded Interbody Fusion Device.

Figura 2.1: Formatos InFuse® Bone Graft. Presentación de los distintos formatos comerciales, consiste en proteína *rhBMP-2* liofilizada, esponja de colágeno absorbible (ACS) de distintos tamaños y solución estéril.

Ya desde el año 2002 la FDA aprueba el uso específico de esta proteína junto con un dispositivo de titanio para la artrodesis lumbar anterior en pacientes con enfermedad degenerativa discal y/o espondilolistesis grado I (FDA, 2002). Luego por el año 2004, el mismo organismo aprueba el uso de InFuse® en el tratamiento de fracturas tibiales abiertas agudas que han sido estabilizadas con fijación intramedular con tornillo (tratamiento estándar) (FDA, 2004). Finalmente la aprobación de una nueva aplicación de *rhBMP-2* más reciente se lleva a cabo el año 2007, en el que se indica como alternativa al injerto óseo autólogo en elevaciones de seno maxilar y aumentos localizados de la cresta alveolar asociadas a exodoncias (extracciones dentales) (FDA, 2007).

El producto mismo cuesta en promedio US\$ 4.000.- (Moore, 2009) y vendió el año 2010 sólo en EE.UU. alrededor de US\$ 703 millones (O'Reilly, 2011), lo que entrega alrededor de 175 mil kits de InFuse® Bone Graft vendidos sólo en EE.UU. ese año. Sin embargo, aun cuando las cifras parezcan favorables, en los últimos años se han publicado reportes en los que se destacan severos efectos secundarios en el uso de este producto, específicamente en la aplicación espinal (Carragee, Hurwitz, & Weiner, 2011), lo que ha producido un baja en las ventas. Luego de aquello, se llegó a estimar que hasta un 85% de los usos de este producto han sido fuera de las especificaciones para las que fue aprobado (O'Reilly, 2011). Este dato hace pensar entonces que la mayoría de los reportes sobre efectos secundarios adversos estarían presentes en pacientes a quienes se les aplicó la proteína en condiciones y procedimientos no autorizados. Es por esta razón que desde 2011, la empresa Medtronic Inc., anunció un convenio de US\$ 2.5 millones con la Universidad de Yale para realizar diversas revisiones respecto a la seguridad y efectividad de InFuse® Bone Graft; esperando que estos resultados se entreguen oficialmente durante el año 2013 (Medtronic INFUSE Bone Graft, 2013). Será este informe entonces, el que entregue el veredicto final respecto a la aplicabilidad de este fármaco.

Aun después de todo este revuelo en el mundo de la traumatología y ortopedia, una encuesta realizada el año 2011 a cirujanos estadounidenses especialista en columna reveló que el 55% de ellos planea continuar con el uso InFuse®, un 44% manifiesta que utilizarían el producto sólo para las indicaciones aprobadas, y un 11% estaba consciente de los riesgos pero cómodo con el uso fuera de especificaciones en ciertas ocasiones (O'Reilly, 2011). De acuerdo a lo anterior, es que claramente aun cuando se definan ciertas especificaciones de forma estricta y absoluta, no se puede controlar el uso que se le da al producto; y quedará a criterio de cada especialista la aplicación dada. Todos estos datos se presentan para entregar la mayor cantidad de antecedentes sobre el producto, su utilización y el contexto actual que lo envuelve; lo que finalmente si puede influir en el tamaño del mercado.

Por otro lado, continuando con el análisis, la empresa Medtronic Inc. posee 270 sucursales repartidas en 120 países, dentro de los cuales, en Latinoamérica sólo está presente en Brasil, Argentina, Colombia, México y Puerto Rico (Medtronic Inc., 2013). Esto coincide con lo mencionado en la subsección anterior, en la que se destaca la gran producción y mercado de los países Brasil y Argentina, y que cuentan con sucursales representantes de estos gigantes entre las empresas de tecnologías médicas. Pues bien, para países como Chile, los productos ofrecidos por estas grandes empresas que no cuentan con oficinas propias en el país, se proveen a través de empresas importadoras; en este caso, Importadora Helico Ltda. es la empresa que provee a Chile de InFuse® Bone Graft. El precio al cual se comercializa el kit más pequeño (tamaño XXS), de 1,05 mg de *rhBMP-2*, es de \$2.800.000.- y es proporcional para el resto de los tamaños de kit¹. Como se puede observar, este precio es bastante alto considerando que las concentraciones son de aproximadamente 1,5 mg/ml de proteína; por lo que pocas personas en Chile están realmente dispuesta a costear ese valor de forma adicional al tratamiento al que se someten. Aun así, esta proteína ha sido utilizada y según datos de aduana, desde el año 2007 hasta 2012, sólo en 2011 existe un registro en el que la Importadora Helico Ltda. habría ingresado al país 26 kit InFuse® Bone Graft tamaño S (4,2 mg de *rhBMP-2*) con un valor de US\$1.870.- cada uno.

OP-1™ Putty y OP-1™ Implant

Un segundo producto de similar aplicación en medicina que contiene como compuesto activo la *rhBMP-7* fue producido por la empresa de desarrollo tecnológico en medicina Stryker® y hoy es comercializado por la división biotecnológica de la marca Olympus® (Olympus Biotech) bajo el nombre de OP-1™ Putty y OP-1™ Implant. Si bien no contiene el mismo principio activo que InFuse® Bone Graft, en 2001 la FDA aprueba el uso de OP-1™ Implant para el tratamiento de no-uniones recalcitrantes en huesos largos en los que el uso de autoinjerto no es factible y tratamientos alternativos han fallado (FDA, 2001). Luego en 2004, se autorizó el uso de OP-1™ Putty como alternativa al autoinjerto en pacientes que requieren una artrodesis lumbar posterolateral, cuyo injerto de hueso autógeno y médula no son factibles o no se espera que promuevan la fusión (FDA, 2004).

2.2.3 Proyecciones Optimistas y Pesimistas de la Oferta

Tal como ya se ha mencionado, la oferta de este tipo de productos en Chile es bastante pequeña y está estrechamente relacionada con los requerimientos de los mismos, entendiéndose su incorporación al

¹ Comunicación directa con Fernando Tellez, Importadora Helico Ltda.

país como venta según encargo. Por otra parte, al tratarse de un fármaco relativamente nuevo, no hay un registro histórico significativo con el que pudiera aplicarse algún modelo de proyección. De esta forma, no es posible realizar una proyección de dicha oferta sin antes analizar la demanda a la que está relacionada y si la satisface o no.

2.3 ANÁLISIS DE LA DEMANDA

En esta sección se presentará una aproximación a lo que podría ser la demanda actual de proteína recombinante humana BMP-2 en Chile y en países como Argentina, Perú, Ecuador y Bolivia basada en datos estadísticos; y se realizará una proyección de la misma para el año 2023. Para ello, dado que se trata de un producto del área de salud, se consideró tomar en cuenta únicamente las aplicaciones que la FDA ha autorizado con el fin de obedecer las especificaciones entregadas por la empresa y los diferentes estudios en pacientes. De esta forma se estudiarán los casos de ALIF, OTF agudas, y finalmente las elevaciones de seno maxilar y aumentos alveolares.

Para realizar este análisis de demanda se recurrió principalmente a fuentes secundarias (estudios clínicos y bases de dato de salud e institutos estadísticos). Además se tuvo acceso a algunas fuentes primarias (médicos especialistas en traumatología y ortopedia, neurocirugía y cirugía maxilofacial); sin embargo no tenían conocimiento de datos estadísticos o números de casos, porque no es habitual publicar aquellos datos o bien porque la mayoría de las veces éstos requieren autorización por parte de los pacientes tratados para su publicación. A grandes rasgos, una afirmación que ya se ha mencionado y que fue validada en general por los especialistas para explicar la poca utilización de *rhBMP-2*, es su alto valor.

2.3.1 Demanda en Chile

Según un estudio solicitado por el MINSAL, respecto a las características de la demanda en el mercado de los medicamentos, se observó que el consumidor ya ha comenzado a sustituir los medicamentos de marca por otros de menor costo (Vassallo, 2010). De hecho, se reporta que a comienzos del año 2000 las ventas de productos de marca disminuían en un 3,55%, mientras que los volúmenes de venta de medicamentos similares aumentaban en un 3,97% y en un 1,34% para los genéricos (Vassallo, 2010); una situación favorable para productores de este tipo de productos. Esto podría deberse al notorio aumento de productos alternativos en el mercado, permitiendo ampliar las posibilidades del

consumidor; y además podría deberse al gran gasto que muchas veces significa comprar medicamentos sin contar con una cobertura total de éstos por los sistemas previsionales de salud.

En Chile, según cifras del año 2010, alrededor del 74% de la población pertenece al sistema previsional de salud público Fondo Nacional de Salud (FONASA), mientras que un 16,5% sería beneficiado por Instituciones de Salud Previsional (ISAPRE); y finalmente un 9,5% estaría cubierto por otros sistemas particulares y de fuerzas armadas (Clínicas de Chile A.G., 2012). Así, casi tres cuartas partes de la población chilena estarían inscritas en el sistema FONASA divididas en cuatro grandes grupos según el nivel de ingreso (A, B, C y D), perteneciendo la mayoría a los tramos A y B (Tobar *et al.*, 2012).

Respecto al gasto en salud, Chile y Argentina son los países de Latinoamérica con el mayor gasto; y con gasto equivalente al 7,8% del PIB en salud (pública y privada) el año 2010, Chile supera al promedio de los países de la región (Clínicas de Chile A.G., 2012). Sin embargo, una gran parte de los gastos corresponden a los denominados “gastos de bolsillo”, costeados directamente por las personas, para financiar copagos, prestaciones de salud y fármacos no cubiertas por los sistemas de previsión. Por ejemplo, en el sistema FONASA los tramos A y B (correspondientes a personas sin ingresos y con ingresos hasta \$193.000.- respectivamente) tienen un porcentaje de copago igual a 0%, mientras que en los tramos C y D corresponde a 10% y 20% respectivamente (Tobar *et al.*, 2012); sin embargo el “gasto de bolsillo” asciende a 88% del gasto privado total (para el año 2010) (Clínicas de Chile A.G., 2012). De esta forma Chile se vuelve en el cuarto país con el “gasto de bolsillo”, dentro del consumo total de los hogares, más alto de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, con un valor de 4,6% (The Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD], 2011)(ver Figura 2.2). Programas de políticas públicas, en términos de Reformas de Salud como el Régimen de Garantías Explícitas en Salud (GES), tienen como uno de sus objetivos justamente disminuir este “gasto de bolsillo” de las personas (Clínicas de Chile A.G., 2012). Estos datos son importantes pues hay que considerar que gran parte del valor del producto final lo va a costear el paciente a través del llamado “gasto de bolsillo”; y sobre todo se debe tener presente, ya que dentro de la Reforma GES que considera 81 problemas de salud, no está presente ninguno de los casos autorizados para aplicar *rhBMP-2*.

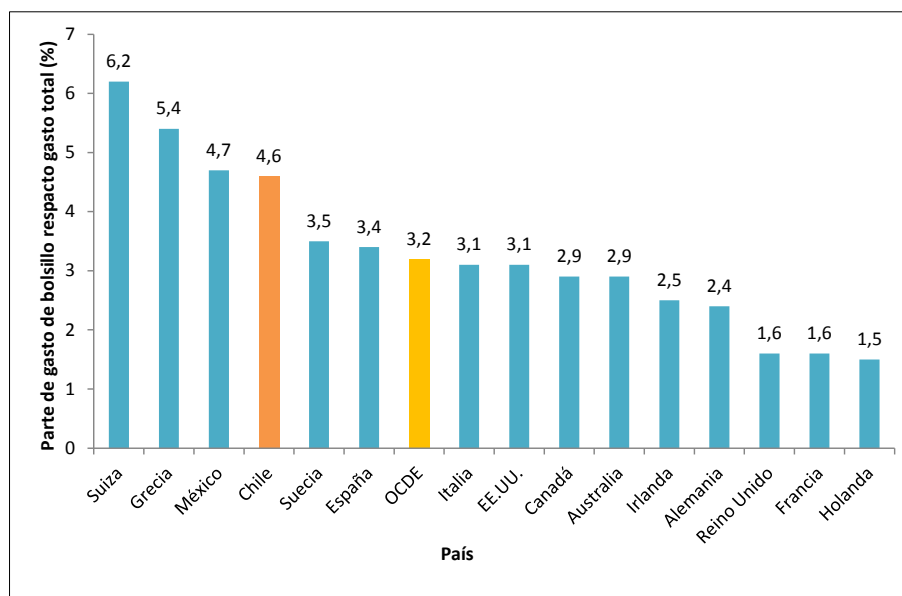


Figura 2.2: Gasto de bolsillo. Se presentan los gastos de bolsillo como porcentaje del gasto total del consumo familiar. Modificado de (OECD, 2011).

Lo anterior es respecto al costo de medicamentos, pero gran parte de los procedimientos aprobados para el uso de proteína morfogenética están relacionados a hospitalizaciones, que desde luego también pueden considerar una parte de “gasto de bolsillo”. Y referente a ese tema Chile también se posiciona como uno de los países con mayores costos diarios por hospitalización con un valor cercano a los \$480.000.- diarios, según un estudio realizado por la Federación Internacional de Planes de Salud (IFHP) el año 2012 (ver Figura 2.3). Dentro de esos gastos se encuentran, por ejemplo, los días cama y medicamentos hospitalarios; para ellos la modalidad libre elección (MLE) del sistema de salud público FONASA, en la que se le permite al paciente acudir a establecimientos de salud privados (inscritos en esta modalidad) si el prefiere (los beneficiados no inscritos en MLE deben atenderse en el sistema público), entrega una cobertura casi nula, mientras que la cobertura alcanzada por Isapres bordea el 75% del precio promedio (ver Figura 2.4 y 2.5) (Clínicas de Chile A.G., 2012).

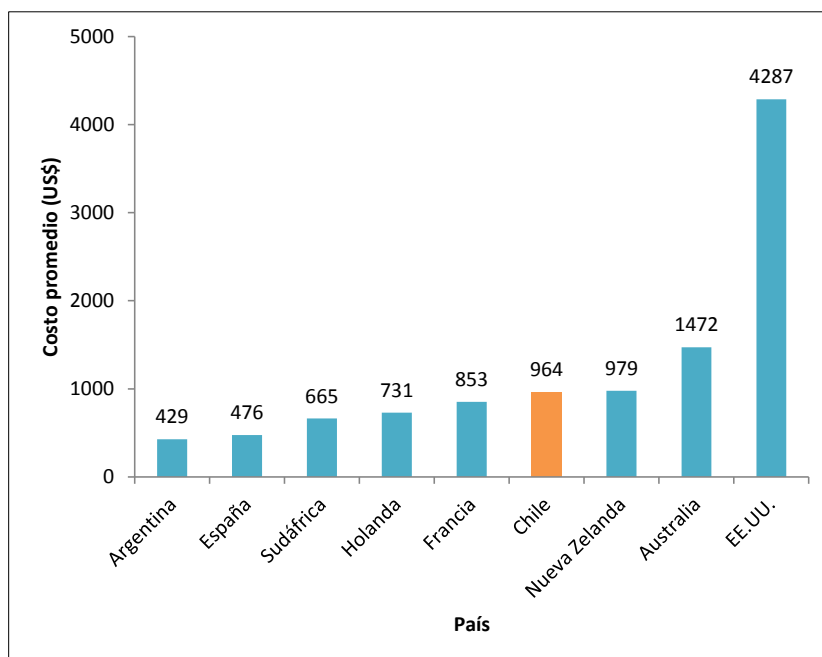


Figura 2.3: Costo diario en hospital. Se presentan los costos promedios por día de hospitalización, en dólares. Modificado de (IFHP, 2013).

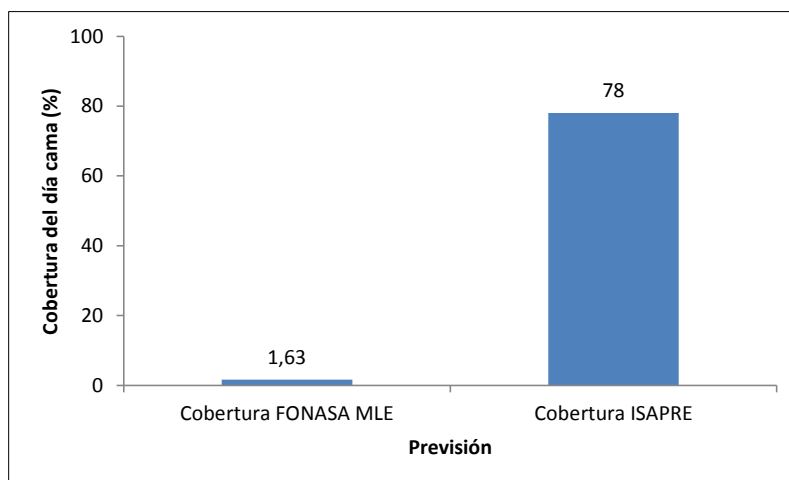


Figura 2.4: Cobertura del día cama según previsión. Cobertura ofrecida por el plan FONASA MLE y por ISAPRE. Modificado de (Clínicas de Chile A.G., 2012).

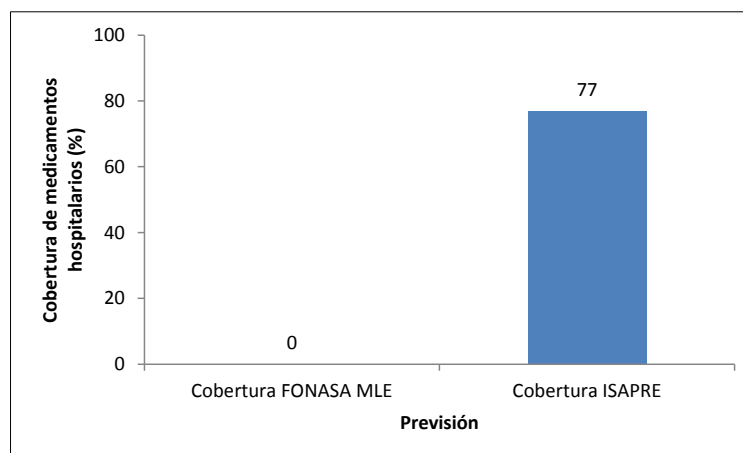


Figura 2.5: Cobertura de medicamentos hospitalarios según previsión. Modificado de (Clínicas de Chile A.G., 2012).

Luego de conocer todo esto índices, se puede tener la idea que la salud en Chile no es de las más baratas; y si bien cuenta con sistemas públicos que disminuyen considerablemente los costos para personas de escasos recursos y en el caso de problemas de salud específicos, es muy probable que productos como el de interés en este trabajo no cuente con este tipo de beneficios, haciendo que su valor efectivamente limite la demanda y se prefiera optar por tratamientos convencionales.

Para la metodología de trabajo de esta sección es importante mencionar que, dado lo específicas de las aplicaciones autorizadas, no existen registros ni publicaciones acerca de la tasa de éstas en Chile. Por otro lado, los datos estadísticos presentados por el Departamento de Estadística e Información de Salud (DEIS) del MINSAL, el Instituto Nacional de Estadística (INE) y la Superintendencia de Salud tampoco exponen directamente datos sobre cualquiera de los tres casos a analizar (columna, tibia y maxilofacial). De forma adicional, cabe indicar que los datos estadísticos del censo nacional realizado en 2012 fueron removidos debido una auditoría interna del INE (Instituto Nacional de Estadísticas [INE], 2013), por lo que los datos estadísticos utilizados serán en base al censo nacional anterior (año 2002) y las posibles correcciones en base a estimaciones realizadas durante 10 años. Sin embargo, continuando con lo anterior, sí se encontraron estudios internacionales específicos para cada uno de los casos de aplicación de *rhBMP-2*, en los que se entregan algunos porcentajes y datos de incidencia de acuerdo a la población total del país de estudio respectivo.

Por otro lado, el MINSAL a través de DEIS sí ha publicado una proyección de la población chilena (basada en censo 2002) al año 2020, actualizada el año 2010, según tipo de sistema de salud, edad, sexo y región (Ministerio de Salud de Chile, DEIS, 2010). Así, la metodología escogida para realizar este estudio fue

cruzar ambos datos (población chilena y datos internacionales) para cada caso y determinar de forma estimada la posible demanda de proteína BMP-2 en Chile.

De esta forma, según la distribución por edad del documento entregado por DEIS, se consideró para los cálculos sólo la población entre 20 y 64 (ver Figura 2.6), pues la restricción del producto comercial indica una aplicación sólo en adultos menores de 65 años. Se conoce que los datos encontrados corresponden ya a una proyección realizada por este organismo gubernamental, pero no se conoce qué modelo y/o ecuación utilizaron para ello para poder extender la proyección al año 2023. En consecuencia, una vez graficados los datos hasta el año 2020, se procedió a encontrar la curva que más se ajustara a ellos; al encontrarla (Ec. 1) se procedió a recalcular todos los datos (desde el año 2005 hasta 2020), obteniéndose un error cercano al $0,61 \pm 0,35\%$.

$$n^{\circ} \text{ habitantes} = 61,598 \cdot (\text{año})^2 - 118734 \cdot (\text{año}) \quad (\text{Ec. 1})$$

Finalmente, una vez encontrada una curva que describiera la proyección realizada y cuyo error fuera despreciable, se procedió a definir la población para los tres años restantes, hasta 2023 (ver Figura 2.6).

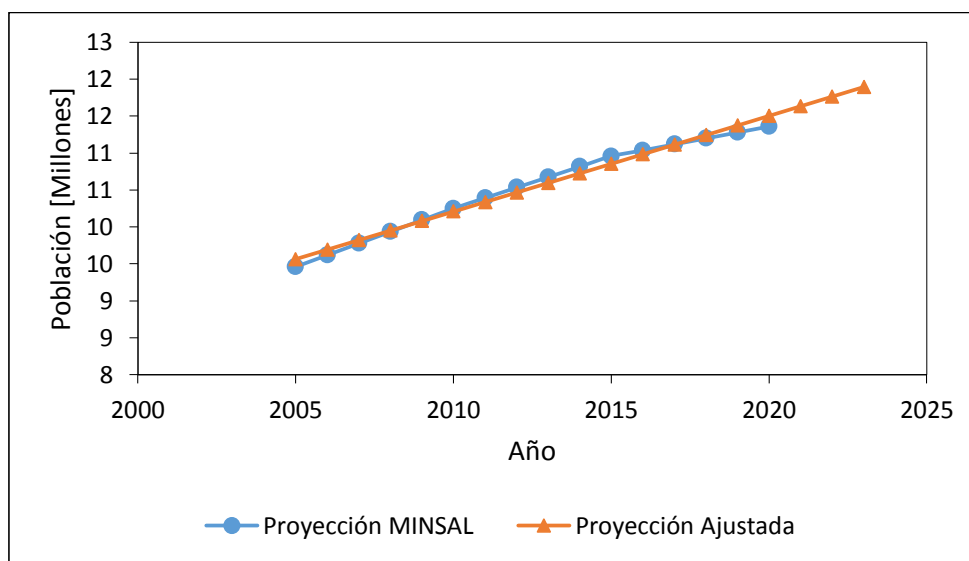


Figura 2.6: Proyección de la población chilena entre 20 y 64 años. Presentación de la proyección realizada por el DEIS hasta el años 2020; y de la proyección ajustada a la Ec.1 hasta el año 2023. Realizado con datos de (Ministerio de Salud de Chile, DEIS, 2010).

Artrodesis lumbar anterior (ALIF)

El dolor de espalda es un problema recurrente en la población. En 2008, sólo en EE.UU., la cantidad de personas que reportó problemas de espalda como condición médica fue de 17,4 millones (The Black Letter, 2011); esta cifra correspondería al 5,72% de la población estadounidense del año 2008 (U.S. Department of Commerce, 2011). Por su parte, en Chile el año 2000, aproximadamente un 25% de la población manifestó haber sufrido dolores de espalda (MINSAL; INE, 2000). Este valor es bastante mayor que el 5,72% de EE.UU., sin embargo no se conoce cuántos de esos dolores realmente requieren atención médica pudiendo ser definidos como condición médica, por lo que esta cifra podría ser menor; pero aun así se estima que sería superior a la tasa estadounidense. No se indagará más en el asunto y simplemente se dejarán ambas tasas como antecedente, pues no se conoce la forma en la que se llevó a cabo cada encuesta, si consideró sólo adultos o desde qué grado de molestia se considera condición médica, etc. Sin embargo, según lo observado en los distintos archivos revisados para este estudio, estas cifras se mantienen relativamente constantes durante los años, por lo que no es errado utilizar índices anteriores (de hace 10 años por ejemplo) o de otros países de características sociales similares. De hecho en una publicación del año 2009 (Alt *et al.*, 2009), se referencia un estudio realizado el año 1999 en el que se estima que en el mundo occidental la prevalencia del dolor de espalda, específicamente en la zona lumbar, abarca desde un 20 a un 40% de la población (Palmer, Walsh, Bendall, Cooper, & Coggon, 2000). Este índice se acerca más al reportado en Chile, no discriminando entre condición médica o no.

Los dolores de espalda se deben a diversos problemas que pueden o no implicar soluciones quirúrgicas; para estas últimas, la *rhBMP-2* ha sido autorizada en artrodesis lumbares en pacientes que presentan una enfermedad degenerativa discal (DDD) y que pudieren presentar espondilolistesis grado I. La DDD, presentada usualmente en individuos sanos y activos (entre 30 y 50 años de edad), ocurre cuando el aro exterior del disco intervertebral (*annulus fibrosus*) se daña o desgasta, produciendo que parte del mismo disco sobresalga y afecte la raíz nerviosa espinal (Garrison *et al.*, 2007). Mientras que la espondilolistesis corresponde al desplazamiento de una vértebra respecto a la vértebra inferior (Goel, Sairyo, Vishnubhotla, Biyani, & Ebraheim, 2006), debido a un defecto en una zona del arco que construye el canal espinal (*pars interarticularis*), generando la inestabilidad de la espina vertebral que produce el deslizamiento de la vértebra (Garrison *et al.*, 2007).

Para las enfermedades mencionadas la fusión espinal ha sido uno de los “gold standards” apuntando a corregir la deformidad, restituir la altura de disco y proveer estabilidad al segmento espinal afectado (Goel *et al.*, 2006), así como también detener el movimiento de la vértebra (Garrison *et al.*, 2007). Sin embargo, la fusión ósea es irreversible y detiene toda movilidad en el lugar del implante, por lo que se percibe como un procedimiento final (última alternativa), en el que se hayan agotado etapas de tratamientos que preserven la movilidad (Kutz & Edidin, 2006). En la actualidad, la cirugía espinal muchas veces involucra el posicionamiento de una “jaula” (cage en inglés), rellena con el material de injerto, en el lugar del disco (Goel *et al.*, 2006). De hecho, la artrodesis es la más común indicación para el injerto óseo (Garrison *et al.*, 2007), siendo el lugar de mayor intervención, la zona lumbar (Boden, 2002). Pero no todo está dicho, pues en este área de la salud, la expansión de nuevas tecnologías para implantes espinales ha sido explosiva, considerando a un mercado global creciendo a una tasa del 20% anual a comienzos de este siglo (Kutz & Edidin, 2006).

En las fusiones espinales, el único material de soporte que hace de este procedimiento el “gold standard” es el injerto autólogo (Wozney, 2002), extraído desde la cresta ilíaca. Sin embargo, debido a las razones mencionadas en la subsección Mercado Competidor que tienen que ver con la morbilidad (dato estadístico sobre la proporción de individuos enfermos) asociada a la extracción de dicho injerto sumada a la variabilidad en la tasa de éxito de fusión (determinada por la calidad y cantidad de injerto recuperado), es que las BMP han provisto la posibilidad de reemplazar el autoinjerto y aumentar la seguridad sobre la osteoinducción y reparación del hueso a través del control de la calidad, actividad y dosis de este agente osteoinductor (Wozney, 2002). Por otro lado, el éxito de los procedimientos de artrodesis también se ve limitado por la tasa de no-uniones (cuando no se logra el grado de fusión ósea buscado), variando de un 10% a un 40% (Boden, 2002); otra fuente indica que la tasa de fusión con autoinjerto es cercana al 85% (McKay *et al.*, 2006), implicando una tasa de no-uni3n de 15% que se encuentra dentro del rango antes mencionado. De todas formas, la falta de uni3n trae como resultado cirugías adicionales y por ende mayores costos médicos y morbilidad (Boden, 2002). En s3, la meta de fusión espinal es finalmente hacer crecer hueso en lugares donde 3ste no crecería normalmente (McKay *et al.*, 2006); y tal como se ha mencionado, los osteoinductores son los más indicados para realizar aquella tarea y dentro de ellos, las BMP son las escogidas a la hora de reemplazar el autoinjerto.

Por otro lado, de forma más concreta, el uso de BMP en intervenciones de tipo ALIF en comparaci3n al uso de autoinjerto, est3 asociado a una reducci3n de 25 minutos (en un rango de 11 a 37 minutos) en el tiempo de operaci3n, atribuible a la eliminaci3n del tiempo de extracci3n del injerto desde la cresta

ilíaca; menores tiempos de hospitalización; y reducción de morbilidad (Garrison *et al.*, 2007). De esta forma y basándose en el hecho que se reduce el tiempo de operación, disminuye la tasa de cirugía de revisión y se reduce el tiempo para regresar a la vida laboral (43 días antes), se reporta que el uso de *rhBMP-2* en las artrodesis lumbares anteriores alcanzarían ahorros que compensan el precio de la proteína (Alt *et al.*, 2009) (ver Tabla 2.3). Esto fue establecido en casos de Alemania, Reino Unido y Francia, en los que el precio de del kit InductOs® es aproximadamente de \$2,2 millones (convertidos según el valor promedio del Euro en 2008) (Alt *et al.*, 2009). Es importante analizar que el valor es más bajo que el precio comercial del fármaco en Chile en su versión más pequeña (kit XXS InFuse® Bone Graft) de 1,05 mg de *rhBMP-2* (\$2.800.000.-), cuando en fusiones espinales la dosis de proteína varía de 4,2 a 12 mg (Sieber, Schwaerzer, & Knaus, 2009). Por otro lado, es importante destacar que Alemania, Francia y Reino Unido, son los únicos países europeos en los que sí existe un reembolso del valor de la proteína por parte del sistema de salud (Alt *et al.*, 2009), ayudando a abaratar los costos del tratamiento con dicha proteína. Sin embargo, un estudio similar realizado en España el años 2006 avala el ahorro en el tratamiento con *rhBMP-2* (ver Tabla 2.3), indicando que, considerando los días laborales ganados debido al temprano retorno a las actividades normales, se generó un ahorro de aproximadamente €920, alrededor de \$610.000.- (según el valor promedio del Euro en 2006) (Acosta, Serrano, Rodríguez, & Lizán, 2008). Por otro lado, como resumen, una revisión establece que el ahorro al utilizar BMP no sería tan grande indicando que el uso de *rhBMP-2* sería poco rentable (Garrison *et al.*, 2007). Finalmente, estos estudios consideran tarifas que pueden variar de acuerdo al país como por ejemplo políticas públicas de salud, sistemas previsionales y de reembolso; y sobre todo, ingresos del paciente al retornar al trabajo (dato relevante, pues es el que mayores beneficios entrega), entre muchos otros, por lo que habría que realizar un tipo de estudio similar bajo las condiciones chilenas para determinar si existe un ahorro considerable.

Tabla 2.3: Ahorro e Ingresos en tratamiento con *rhBMP-2*.

País	Ahorros [Pesos chilenos]		Ingresos [Pesos chilenos]	Modificado de
	Menor tiempo de operación	Intervenciones secundarias	Retorno temprano a vida laboral	
Alemania ¹	276.969	257.131	5.938.429	(Alt, y otros, 2009)
Francia ¹	825.566	576.828	5.610.339	
Reino Unido ¹	838.537	317.408	5.380.676	
España ²	353.510	218.776	4.461.563	(Acosta, Serrano, Rodríguez, & Lizán, 2008)

¹ Según valor Euro (€) en 2008² Según valor Euro (€) en 2006

En Chile, no se tiene conocimiento de la tasa de ALIF realizadas, pero existen algunos centros hospitalarios y clínicos que publican algunos datos, permitiendo conocer por ejemplo, que se realizan 300 intervenciones quirúrgicas en el área de traumatología de columna en la Clínica Alemana en Santiago (Clínica Alemana, 2010). Por otro lado, alrededor del 12% de las consultas privadas en Chile son en el área traumatológica ascendiendo a un número cercano a 1 millón en los años 2008, 2009 y 2010 (Ministerio de Salud de Chile; DEIS, 2010) donde cerca del 80% corresponde a mayores de 20 años. Por otro lado, las intervenciones quirúrgicas en traumatología y ortopedia en atención privada alcanzan las 114.367 el año 2008 y para el año 2010 se registraron 58.464 (Ministerio de Salud de Chile; DEIS, 2008 - 2010), donde en promedio un 84% corresponde a mayores de 20 años. Mientras que los egresos hospitalarios totales (considerando todos los sistemas de previsión) relacionados a enfermedades del sistema osteomuscular y tejido conjuntivo bordean los 56.000 por año desde 2006 hasta 2010 (Ministerio de Salud de Chile; DEIS, 2006 - 2010).

Si bien los datos recién entregados ayudan a conocer la envergadura del campo traumatológico y el contexto de este mercado, no permiten estimar de forma adecuada la demanda de *rhBMP-2* según su aplicación específica (ALIF). Es por ello que se opta por trabajar con el índice de un estudio publicado el año 2007 que trata específicamente la efectividad clínica y de costo de las BMP en fusiones espinales (Garrison *et al.*, 2007); en él se le encarga el estudio económico a ABACUS International, una consultora de salud especializada en marketing, economía y comunicaciones. Esta consultora, plantea un modelo que estima la realización de 1000 ALIF al año en Inglaterra (Garrison *et al.*, 2007); según la oficina de estadísticas nacionales la población inglesa del año 2006 fue de 53.763.000 (Bray, 2008), por lo que el número de ALIF corresponde a un 0,00186% de la población total. Este último dato se extrapola a la población en Chile.

Entonces, para proceder a la determinación de la demanda se consideró la población entre 20 y 64 años (ver Figura 2.6), por las razones mencionadas al inicio de esta subsección; al cruzar la proyección de población con el porcentaje de ALIF calculado se obtienen valores que perfectamente podrían corresponder a la tasa nacional (ver Tabla 2.4), simplemente al compararlo con el dato de intervenciones quirúrgicas de columna en la Clínica Alemana. Luego, considerando los porcentajes de cada tipo de previsión al que está asociada la población chilena (74% FONASA; 16,5% ISAPRE; 9,5% Otro) se obtuvo el siguiente resultado (ver Tabla 2.4) (ver Apéndice A para detalles de cálculo), donde claramente se desglosa el panorama obteniendo un número de ALIF bastante heterogéneo según el tipo de previsión, pero relativamente constante en el tiempo. Cabe destacar que se decidió no variar

el porcentaje de distribución de la población según su previsión, pues no se cuenta con criterios o conocimientos suficientes como para arrojar alguna cifra estimativa para el futuro.

Tabla 2.4: Proyección del número anual de ALIF hasta 2023.

Año	Población (20 a 64 años)	Nº Total ALIF	FONASA	ISAPRE	Otro
2005	9.563.830	178	132	29	17
2006	9.692.166	180	133	30	17
2007	9.820.624	183	135	30	17
2008	9.949.206	185	137	31	18
2009	10.077.911	187	139	31	18
2010	10.206.740	190	140	31	18
2011	10.335.691	192	142	32	18
2012	10.464.766	195	144	32	18
2013	10.593.964	197	146	33	19
2014	10.723.285	199	148	33	19
2015	10.852.730	202	149	33	19
2016	10.982.297	204	151	34	19
2017	11.111.988	207	153	34	20
2018	11.241.802	209	155	35	20
2019	11.371.739	212	157	35	20
2020	11.501.799	214	158	35	20
2021	11.631.983	216	160	36	21
2022	11.762.289	219	162	36	21
2023	11.892.719	221	164	36	21

Escenario Pesimista

En este caso, se opta por omitir los posibles casos relacionados a FONASA, debido a que no se prevé que este sistema de previsión entregue algún tipo de cobertura de una cirugía tan compleja como es el caso de las ALIF y para un medicamento tan caro como el desarrollado en este proyecto, pues no hay tratamientos similares cubiertos por este sistema previsional que permitieran entregar alguna proyección sobre la ampliación de la cobertura a este tratamiento. Y se pretende abarcar un 20% del total de ALIF estimado en el caso de la previsión por ISAPRE (6-7 ALIF anuales aproximadamente) y un 5% para el caso de otras previsiones (1 ALIF anual) (ver Figura 2.7). Esto entrega un total de 8 ALIF por año en promedio, hasta el 2023.

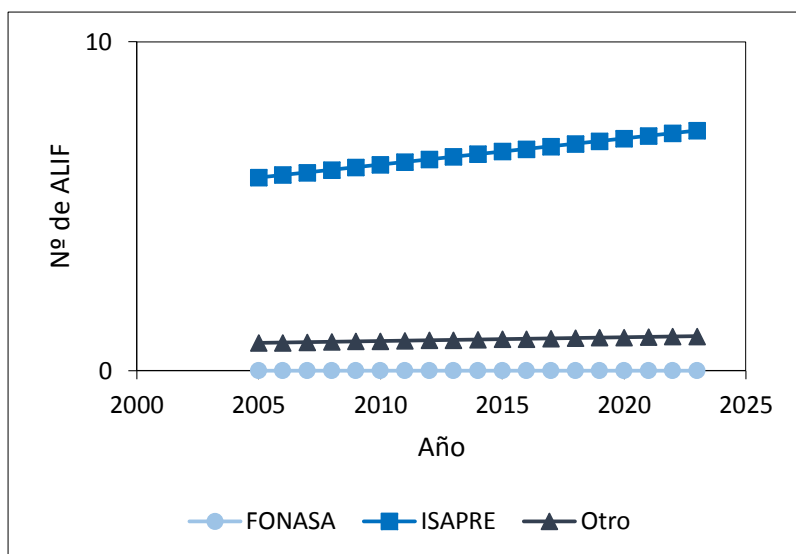


Figura 2.7: Proyección ALIF bajo escenario pesimista. No se consideran casos FONASA y se pretende abarcar un 20% de los casos ISAPRE y un 5% de otro tipo de previsión.

Escenario Optimista

Para el caso optimista, se pretende abarcar el 10% de los casos asociados a FONASA, un 70% del total de la previsión por ISAPRE y un 20% de otras previsiones. Esto entrega un total aproximado de 42 ALIF por año, hasta el 2023 (ver Figura 2.8).

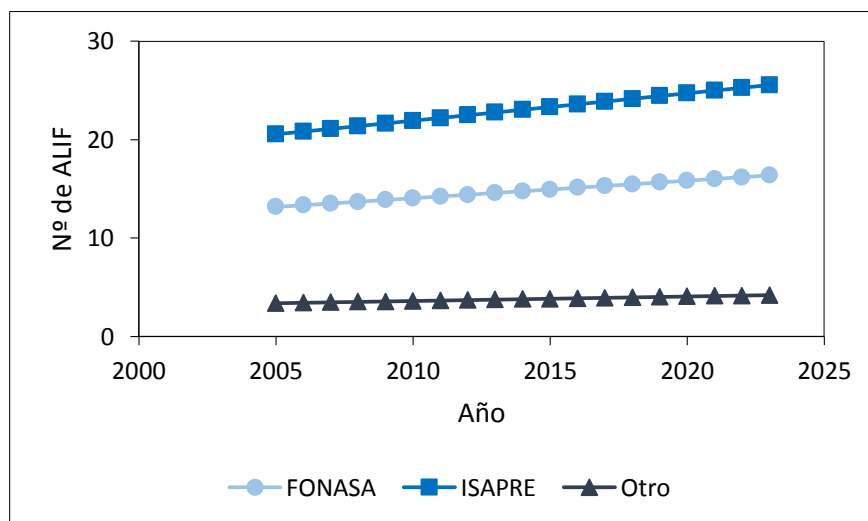


Figura 2.8: Proyección ALIF bajo escenario optimista. Se considera el 10% casos FONASA, un 70% de los caso ISAPRE y un 20% de otro tipo de previsión.

Demanda asociada a ALIF

Finalmente, luego de analizar ambas perspectivas se opta por abarcar un 2% de FONASA, pues aunque es muy poco probable que se realice este tipo de operaciones y que además se incluya la aplicación de proteína, pacientes del tramo D de FONASA tal vez podrían acceder a estos beneficios. Por otro lado, se pretende abarcar un 40% de los casos ISAPRE y un 10% de otro tipo de previsión. Entregando un mercado de aproximadamente 20 ALIF anuales (ver Figura 2.9).

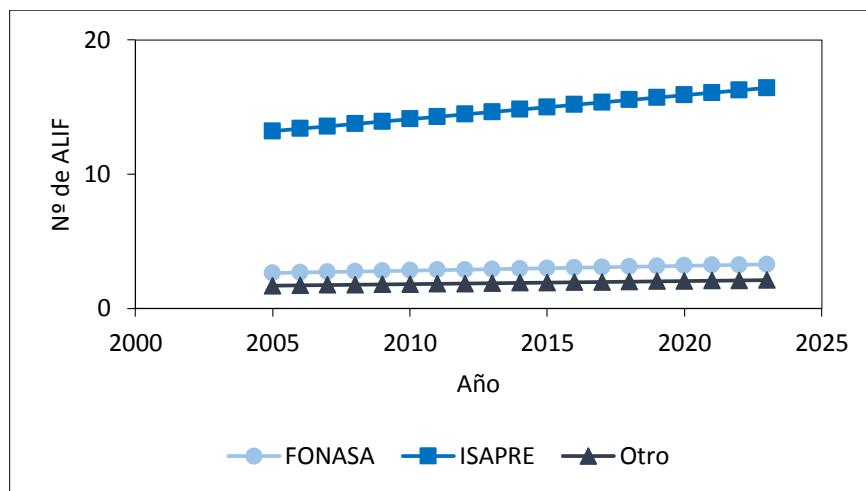


Figura 2.9: Proyección ALIF caso realista. Se considera el 2% casos FONASA, un 40% de los caso ISAPRE y un 10% de otro tipo de previsión.

Fractura tibial abierta (OTF)

Las fracturas son accidentes con los que muchos se sienten relacionados y afectan de forma común cualquiera de las extremidades. La Asociación Chilena de Seguridad (ACHS) establece que en el 2012 el 11% de los accidentes que originan día perdidos corresponden a accidente en las piernas, el 6% en los brazos, 30% en las manos y dedos de las manos, y un 13% en los pies. En Chile, según la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010, la prevalencia de fracturas en general alcanza un 17,9% (Ministerio de Salud; Pontifica Universidad Católica Stgo; Universidad Alberto Hurtado, 2011), lo que incluiría fracturas de cualquier tipo en cualquier hueso. En EE.UU., por ejemplo, se ha estimado que específicamente las fracturas de huesos largos comprenden el 10% de todas las lesiones no fatales (Garrison *et al.*, 2010) y aproximadamente el 50% de estas fracturas corresponderían a falanges (dedos de manos y/o pies) o tibias (Court-Brown *et al.*, 1997) (Garrison *et al.*, 2010).

Dentro de la gran cantidad de posibles fracturas, existe una clasificación que las divide en dos grandes grupos: fracturas abiertas y fracturas cerradas. Se entiende por fractura cerrada si la piel no está comprometida; mientras que en una fractura abierta el hueso sobresale a través de la piel o comunica a una herida, aumentando el riesgo de infección (Garrison *et al.*, 2007). Adicionalmente, otra clasificación que indica el grado de gravedad de la fractura abierta es la establecida por R.B. Gustilo y J.T. Anderson los años 1976 y 1984, donde las fracturas más graves corresponden a las grado III (Gustilo & Anderson, 1976) (Gustilo, Mendoza, & Williams, 1984)(ver Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Grados de gravedad en OTF abiertas.

Grado	Definición	Fuente
I	Fractura abierta con una herida de tamaño menor a 1 cm de largo y limpia.	
II	Fractura abierta con una laceración mayor a 1 cm de largo, sin daños en los tejidos blandos o avulsiones (eliminación de capas de piel)	(Gustilo & Anderson, 1976)
III	Ya sea una fractura abierta segmental, una fractura abierta con daño en el tejido blando, o una amputación traumática.	
IIIA	Fractura abierta de grado III con cobertura adecuada de tejido blando a pesar del extensivo daño e independiente del tamaño e impacto de la herida.	
IIIB	Fractura abierta grado III con daño extensivo en el tejido blando con raspado y exposición del hueso periosteal. Está usualmente asociado a contaminación.	(Gustilo, Mendoza & Williams, 1984)
IIIC	Fractura abierta grado III asociada a un daño arterial que requiere reparación.	

Respecto a la prevalencia en tibia, las fracturas diafisarias (de la diáfisis de la tibia) son las fracturas de huesos largos más comunes encontradas por cirujanos ortopédicos (Tzioupis & Giannoudis, 2007). Los defectos encontrados van generalmente desde los 3 hasta los 17 cm de envergadura (Suk, 2009), regularmente requieren de tratamiento operatorio si no pueden ser reducidas o cuando son abiertas (Tzioupis & Giannoudis, 2007). El tratamiento a estas fracturas tibiales es complejo, debido al precario suplemento de sangre y ausencia de tejido blando en la cobertura del eje tibial lo que hace que el problema mayor radique en que estas fracturas sean vulnerables a infección y no-union (Bhandari,

Guyatt, Swiontkowski, & Schemitsch, 2001). Se ha reportado que la tasa de infección puede alcanzar hasta el 50% cuando se trata de fracturas tipo IIIB (Bhandari *et al.*, 2001). Sin embargo sólo un 23,1% de todos los pacientes con fracturas requieren operación por falta o falla en la unión (Schmidmaier, Schwabe, Willdemann, & Haas, 2007). Por otro lado, hay que considerar que la mayor tasa de no-uniones se registra en fracturas en el eje tibial (Tzioupis & Giannoudis, 2007); una revisión publicada el año 2010 (Garrison *et al.*, 2010) referencia que esta tasa se encuentra en un rango de 4 a 10% (Littenberg *et al.*, 1998).

En el caso específico de las fracturas tibiales abiertas (OTF), el 6% termina en no-uniones, es decir, en un tiempo mayor a 37 semanas aún no se produce la unión; y en su mayoría (82%) se trata de fracturas grado III (Giannoudis, Papakostidis, & Roberts, 2006). En cambio, la prevalencia de uniones tardías de fracturas del eje tibial es de 16 a un 60% en casos menos severos (fracturas tipo I, II y IIIA) y de 43 a 100% para casos severos (tipo IIIB y IIIC) (Claudle & Stern, 1987) referenciado por (Govender, Csimma, Genant, & Valentin-Opran, 2002); entonces, entre más tarde efectivamente en fusionar y reparar el hueso, más podría aumentar la posibilidad de generar una no-unión. De esta forma, cuando la curación de la fractura se tarda, es posible requerir una segunda intervención, lo que se asocia a altas tasas de morbilidad del paciente y baja calidad de vida; por lo que la idea de cualquier procedimiento sería disminuir esa posibilidad, así como también sus riesgos y costos, asegurando o incrementando la tasa de unión (Govender *et al.*, 2002).

En el caso de las fracturas tibiales, el problema de morbilidad no está asociado a una segunda cirugía para recuperar autoinjerto como en el caso de la artrodesis, sino que el problema que aqueja es el hecho de la difícil reparación del hueso tibial. En este caso, las BMP no son elegidas por su capacidad de reemplazar el injerto autólogo, sino netamente por su actividad osteoinductora. Para ello se realiza una fijación con tornillos que posiciona el hueso donde corresponde y lo mantiene firme, y luego se podría incluir el tratamiento con BMP en una matriz absorbible, generalmente colágeno (el uso aprobado de *rhBMP-2* implica una fijación con clavos).

De acuerdo a lo anterior, utilizando concentraciones de 1,5 mg/ml de *rhBMP-2*, una revisión publicada el año 2002 (Govender *et al.*, 2002) presenta los siguientes resultados comparados con un grupo control sometido al tratamiento estándar (fijación intramedular con clavos y manejo rutinario del tejido blando): (1) sólo un 26% de los pacientes requirió una segunda intervención versus un 46% del grupo control; (2) una reducción del 44% respecto al grupo control, de los riesgos de curación en una segunda

intervención; (3) un 24% de tasa de infección contra un 44% en el grupo control; (4) los pacientes con dolor en el grupo control correspondían al 79%, y en el grupo *rhBMP-2* al 68%; (5) la presencia de anticuerpos fue poco frecuente (1% en grupo control y 6% en grupo *rhBMP-2*) y no hubo relación evidente entre anticuerpos anti-BMP-2 y los resultados clínicos o eventos adversos que indicaran una respuesta alérgica; (6) y finalmente, el tratamiento con BMP se asoció a un 65% de éxito, entendido como unión de la fractura sin requerir segunda intervención, mientras que esta misma cifra alcanzó el 47% en el grupo control. Por lo que como conclusión se obtuvo que existe notablemente menos fallas en la reparación de la fractura al utilizar *rhBMP-2*; representado en números por 16 fallas en 145 pacientes (11,03%), comparado con 32 fallas en 147 (21,77%) pacientes con tratamiento convencional (Govender *et al.*, 2002), cerca de un 50% menos de fallas.

Estos resultados se suman además al hecho que el tiempo de recuperación con el tratamiento de BMP se reduce considerablemente, tomando 145 días para la reparación del hueso; mientras que bajo el tratamiento convencional la reparación tarda 184 días (Govender *et al.*, 2002). Otro estudio indica que el tratamiento convencional demora 192 días en promedio para restituir el hueso (Alt *et al.*, 2009); sin embargo los objetivos de ambos estudios son distintos. En el estudio de Govender *et al.*, se pretende observar el efecto biológico de la *rhBMP-2*, descartando aquellos pacientes que requirieron segundas intervenciones (definiendo como fracaso no intervenir por segunda vez, pero no lograr unión en la fractura) (Govender *et al.*, 2002); mientras que en la publicación de Alt *et al.* se apunta al enfoque económico, midiendo el impacto del tiempo de sanación en la pérdida de productividad por inactividad laboral, incluyendo a pacientes con y sin intervenciones secundarias (Alt *et al.*, 2009), haciendo que el tiempo de unión promedio sea mayor. Para observar la diferencia en los tiempos de reparación ver Tabla 2.6. De todas formas, la reducción en el tiempo de recuperación es considerable, siendo cercana a los 40 días, es decir, la persona gana más de un mes cuando se trata con *rhBMP-2*.

Tabla 2.6: Comparación del tiempo promedio de unión de OTF. Traducido de (Garrison *et al.*, 2007).

Categoría de severidad	Grupo Control [Semanas]	Grupo BMP [Semanas]	Semanas Ganadas [Semanas]
Gustilo Tipo I	29,71	27,57	2,14
Gustilo Tipo II	26,86	21,14	5,72
Gustilo Tipo IIIA	35,57	30,86	4,71
Gustilo Tipo IIIB	44,00	32,57	11,43
Gustilo Tipo IIIC	44,00	32,57	11,43

Si bien se han registrado varias ventajas respecto a la calidad de fusión y tiempo de recuperación con el uso de proteína recombinante, hay evidencia que los costos médicos asociados a este tratamiento probablemente excedan a aquellos asociados a un tratamiento estándar; sin embargo la magnitud de esta diferencia tiende a decrecer a medida que aumenta la severidad de la fractura (Garrison *et al.*, 2010). Así, el uso de *rhBMP-2* para el tratamiento de OTF puede ser evaluado de forma favorable económicamente, cuando se restrinja a pacientes con fracturas más severas y donde los criterios de decisión también pasan por considerar los impactos de tratamientos alternativos en la productividad y relación de salud – calidad de vida (Garrison *et al.*, 2010). De hecho, es posible que una proporción o todo el costos médico directo del tratamiento de la fractura, al utilizar BMP, sea compensado por la reducción en los costos médicos asociados a complicaciones, segundas intervenciones y por el retorno temprano a la actividad productiva (Garrison *et al.*, 2010). Por otro lado, la rentabilidad final de la alternativa con BMP para el caso de las OTF mejoraría también si disminuyera el costo de esta proteína (Garrison *et al.*, 2007). Así como en el caso de la artrodesis lumbar, se realizó un estudio del efecto económico del tratamiento con *rhBMP-2* en OTF grado IIIA y IIIB, arrojando resultados favorables para cada caso de tratamiento y recuperación con esta proteína (ver Tabla 2.7) (Alt *et al.*, 2009). Pero tal como se mencionó en el caso de fusión lumbar, los países considerados en ese estudio (Francia, Alemania y países del Reino Unido) cuentan con un sistema de salud que provee un reembolso del tratamiento con uso de proteína. Para conocer si realmente sería rentable en Chile el uso de esta proteína habría que extrapolar los resultados en términos de tiempo y adjudicarles valores correspondientes de este país.

Tabla 2.7: Ahorro total por uso de *rhBMP-2* por caso de recuperación de OTF grado III. Modificado de (Alt *et al.*, 2009).

País	Ahorro [Pesos chilenos]
Alemania	4.806.900
Francia	4.838.183
Reino Unido	4.327.736
Según valor Euro (€) en 2008	

Ahora, para estimar la posible demanda de *rhBMP-2* para el tratamiento de fracturas tibiales abiertas agudas, tampoco se conocen datos específicos más allá de la cantidad de consultas e intervenciones quirúrgicas en el área de traumatología, correspondientes a los mismos índices mencionados en el caso de ALIF. Por otro lado, se sabe que los egresos hospitalarios anuales atribuibles a traumatismos,

envenenamientos y otros, bordean los 150.000 desde el año 2001 al 2010; lo que realmente no ayuda mucho, pues no se especifica qué tipo y grado de traumatismo (Ministerio de Salud de Chile; DEIS, 2006 - 2010). Por ende, se aplicó la misma metodología utilizada en el caso de artrodesis lumbares anteriores: considerando una proyección de la población, entre 20 y 64 años (ver Tabla 2.6), al año 2023, cruzando estos valores con índices arrojados por estudios extranjeros. La tasa específica de OTF encontrada fue de 5,53 cada 100.000 personas (en Reino Unido) (Garrison *et al.*, 2007), lo que corresponde a una incidencia del 0,00553%. Por otro lado, se encontró que la ocurrencia OTF grado IIIA y IIIB es de 2,8 cada 100.000 personas (Alt *et al.*, 2009) (0,0028%). Este dato permitió realizar un análisis que sólo abarque las fracturas más severas, grado IIIA y IIIB (ver Tabla 2.8) (ver Apéndice A para detalles de cálculo).

Tabla 2.8: Proyección del número anual de OTF grado IIIA y IIIB hasta 2023.

Año	Población (20 a 64 años)	Nº Total OTF Grados IIIA/B	FONASA	ISAPRE	Otro
2005	9.563.830	268	198	44	25
2006	9.692.166	271	201	45	26
2007	9.820.624	275	203	45	26
2008	9.949.206	279	206	46	26
2009	10.077.911	282	209	47	27
2010	10.206.740	286	211	47	27
2011	10.335.691	289	214	48	27
2012	10.464.766	293	217	48	28
2013	10.593.964	297	220	49	28
2014	10.723.285	300	222	50	29
2015	10.852.730	304	225	50	29
2016	10.982.297	308	228	51	29
2017	11.111.988	311	230	51	30
2018	11.241.802	315	233	52	30
2019	11.371.739	318	236	53	30
2020	11.501.799	322	238	53	31
2021	11.631.983	326	241	54	31
2022	11.762.289	329	244	54	31
2023	11.892.719	333	246	55	32

Escenario Pesimista

En este caso y repitiendo el criterio utilizado en el caso de ALIF, se optó por omitir los posibles casos relacionados a FONASA y abarcar un 20% del total de OTF estimadas en el caso de la previsión por

ISAPRE y un 5% para el caso de otras previsiones. Esto entrega un total de 11 OTF grado IIIA y IIIB por año en promedio, hasta el 2023 (ver Figura 2.10).

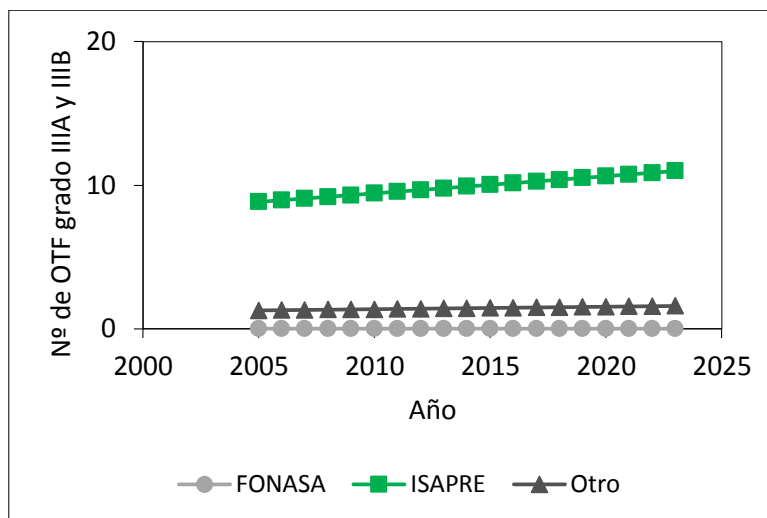


Figura 2.10: Proyección OTF bajo escenario pesimista. No se consideran casos FONASA y se pretende abarcar un 20% de los casos ISAPRE y un 5% de otro tipo de previsión.

Escenario Optimista

Para el caso optimista, se pretende considerar en el análisis un 10% de los casos FONASA, un 70% de ISAPRE y un 20% de otras previsiones. Esto entrega un total de 60 OTF por año en promedio, hasta el 2023 (ver Figura 2.11).

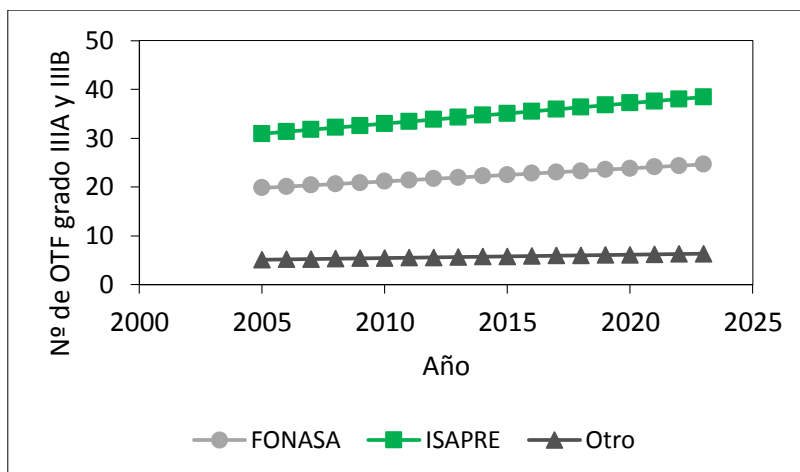


Figura 2.11: Proyección OTF bajo escenario optimista. Se considera el 10% casos FONASA, un 70% de los caso ISAPRE y un 20% de otro tipo de previsión.

Demanda asociada a OTF

Finalmente, luego de analizar ambas perspectivas se opta por no abarcar casos FONASA, por ser poco probable la posibilidad del uso de BMP en el caso de fracturas; un 40% de ISAPRE y 10% de otro tipo de previsión. Entregando un mercado de aproximadamente 23 OTF grado IIIA/B anuales (ver Figura 2.12)

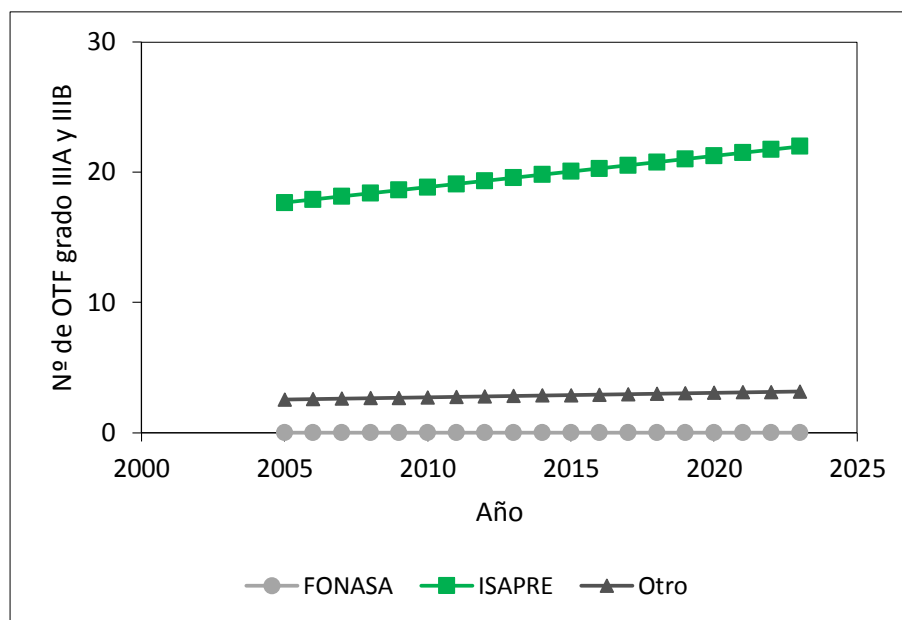


Figura 2.12: Proyección realista OTF. Se omiten los casos FONASA y se considera un 40% de los casos ISAPRE y 10% de otro tipo de previsión.

Elevación del seno maxilar y aumento alveolar

En este caso, la aplicación de *rhBMP-2* está directamente relacionado con la pérdida dentaria y el mercado de implantes dentales. Respecto a lo anterior, según el informe anual de la empresa internacional Straumann, productora de sistemas de implante, instrumentación y productos de regeneración de tejidos, entre un 50 y 60% de los adultos de los países desarrollados han perdido a lo menos un diente, siendo en promedio 3 o 4 (Straumann, 2012). A su vez, la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS) reportó en el 2013 que un 66% de los adultos entre 35 y 44 años han perdido por lo menos un diente permanente en un accidente o por enfermedad y que a la edad de 74 años, el 26% ya ha perdido la totalidad de los dientes. Particularmente en Chile, el año 2003 el MINSAL estableció que más del 70% de la población manifiesta tener su dentadura incompleta

(Oporto, Fuentes, Álvarez, & Borie, 2008); mientras que la Encuesta Nacional de Salud, fijó que el 80% de los adultos entre 35 y 44 años no conserva su dentadura completa, aumentando esa cifra a un 99% en personas de 65 a 74 años (Gobierno de Chile, 2012). Así, se observa que Chile sobrepasa por poco los índices mundiales de países desarrollados, respecto a la pérdida dentaria, haciendo aún mayor la necesidad de conseguir tratamientos que remedien esa pérdida.

Se dice que el éxito de los tratamientos de rehabilitación oral depende, de forma general, de la presencia de piezas dentarias que puedan soportar una prótesis, o bien en el remanente óseo que cumpla estas funciones (Oporto *et al.*, 2008). Como solución a ello, la implantología se ha convertido en una excelente alternativa frente a la pérdida de piezas dentarias, logrando una tasa de éxito del 95 al 99% (Fuentes, Weber, Flores, & Oporto, 2010). Sin embargo, esta solución se torna compleja al presentar pobre remanente óseo, por lo que se requiere recuperar la cantidad de hueso perdido para reestablecer la forma y función del reborde alveolar y crear un buen soporte que pueda recibir el implante (Oporto *et al.*, 2008), mientras que la elevación del seno maxilar corresponde al procedimiento de injerto llevado a cabo cuando la cantidad de hueso en la mandíbula superior del paciente es inadecuada para acomodar un implante dental (AAOMS, 2008 - 2013). De esta forma, el grupo de consultoría y estudio de mercado dedicado al sector de salud, iData Research Inc. estableció que, durante el 2012 en EE.UU., un 55,1% de los implantes dentales realizados utilizaron algún tipo de injerto; y que se espera que este porcentaje aumente en el tiempo, a medida que los injertos de hueso para procedimientos de implante se vuelvan más estandarizados y se realicen procedimientos de implante más complejos (iData Research Inc., 2013). Sin embargo una cifra más conservadora es publicada en el informe anual de la empresa Straumann en la se indica que más de 1 en 4 implantes requiere aumento óseo o trasplante, ya sea antes o en conjunto con la colocación del implante (Straumann, 2012); lo que equivaldría a algo más del 25% de los casos, pero no un 55% como se señala para el mercado estadounidense. Este dato (25%) se utilizará más adelante para la determinación de la demanda en Chile.

Para los implantes que requieren la incorporación de injerto, nuevamente el de tipo autólogo es el “gold standard”; y los sitios de donación más frecuentes para su extracción corresponden al mentón y la región retromolar; cuando la cantidad de hueso es mayor, se suele recurrir a la cresta ilíaca (Muñoz & Trullen, 2008). Sin embargo, últimamente en EE.UU. los aloinjertos han aumentado su cuota global a un 44,5%; y adicionalmente muchos dentistas a menudo mezclan varios materiales de injerto en orden de obtener mejores resultados clínicos (iData Research Inc., 2013). Esto último puede ser una

ventaja para el uso del producto de BMP, pues al ser proteínas osteoinductoras y venderse en un formato que las presenta de forma pura (obviando la presencia de excipientes correspondientes), entrega mucha versatilidad en el uso y facilita la combinación con otro tipo de injerto. Así, como ya se ha indicado en la definición del producto, se permite el uso de este producto como tratamiento principal o secundario, pudiendo combinarse con otro tipo de injerto.

Dado que la aprobación para utilizar *rhBMP-2* en tratamientos maxilofaciales es relativamente nueva, no hay a disposición muchos estudios clínicos más allá de aquellos necesarios para dicha aprobación. En estos estudios, a una concentración de proteína de 1,5 mg/ml se presentan resultados bastante favorables, como por ejemplo: a 6 meses del procedimiento de colocación del injerto, la densidad ósea en el grupo de pacientes tratados con proteína fue bastante mayor en comparación al grupo tratado con autoinjerto; y al cabo de 3 años, esta diferencia era de un 14% más densos en el grupo de BMP respecto al grupo autoinjerto (Spagnoli, 2009). Lo que podría hacer pensar que el uso de BMP finalmente implica la generación de un soporte para el implante de mejor calidad. Por otro lado, no se observó el desarrollo de anticuerpos para *rhBMP-2*, colágeno bovino o colágeno humano tipo 1 en los pacientes estudiados (Spagnoli, 2009).

Respecto al análisis económico, no se encontró alguno desarrollado a cabalidad o de forma similar a los casos de artrodesis y OTF, para esta aplicación dental; esto se puede deber a que para llevar a cabo este tipo de estudios comparativos, se requiere comprar el proceso de los pacientes durante un tiempo (años). Por lo que no se cuentan con datos económicos respecto al tratamiento con BMP versus el tratamiento convencional; sin embargo se estará revisando constantemente durante este año la aparición de nuevos estudios relacionados al tema, que pudieran abarcarlo de la forma que se requiere.

Por otro lado, las estadísticas chilenas indican que alrededor del 70% de todas las consultas y altas odontológicas corresponden a personas mayores de 20 años (Ministerio de Salud de Chile, DEIS, 2010). Para los años 2008, 2009 y 2010, el total de consultas odontológicas en establecimientos no pertenecientes al sistema nacional de servicios de salud es cercano a los 120.000 por año, mientras que las altas odontológicas bordean los 25.000 anuales; finalmente los procedimientos de exodoncia (retiro de piezas dentales) son alrededor de 75.000 al año y los tratamientos de traumas dento alveolares han aumentado notablemente desde cerca de 430 el año 2008 a aproximadamente 2750 para el año 2010 (Ministerio de Salud de Chile, DEIS, 2010).

Tal como ha sucedido en los casos anteriores en este estudio, no hay registros sobre la tasa de implantes en Chile y los datos públicos no permiten estimar una demanda tan específica como es el caso actual. Por ende, considerando una población entre 20 y 64 años (ver Tabla 2.6) se extrapolarán datos de estudios internacionales; el dato utilizado corresponde a un estudio realizado por la empresa Straumann antes nombrada, en la que se indica que entre 45 y 55% de la población adulta estadounidense se ve afectada por piezas dentales, de los que sólo entre 5 y 10% busca tratamiento y finalmente entre un 45 a un 55% realmente recibe un tratamiento, que consiste entre un 15-20% en implante y entre un 80 y 85% en tratamiento convencional (Straumann, 2012) (no especificado). Los datos utilizados corresponden a los promedios de los índices recién mencionados; y por otro lado, se consideró el índice entregado por la Encuesta Nacional de Salud mencionado al inicio de esta subsección (80% de la población entre 35 y 44 años no conserva su dentadura completa). Además, el año 2012 FONASA presentó un plan que incluye la realización de 1500 implantes dentales a personas entre 20 y 65 años de edad (Gobierno de Chile, 2012); dato que será considerado para el porcentaje de población inscrita en FONASA. Se decidió mantener este número durante la proyección hasta el año 2023, pues aunque es muy probable que aumente, es difícil arriesgarse con algún tipo de pronóstico en lo referente a políticas públicas de salud sobre todo en temas de inclusión de nuevas coberturas a enfermedades. Finalmente se recuerda el dato mencionado en esta sección, donde más de un 25% de los implantes requieren un injerto y que será considerados para el análisis. De esta forma se calcula la cantidad total estimada de implantes que requieren injerto y que podrían utilizar *rhBMP-2* (ver Tabla 2.9) (ver Apéndice A para detalles de cálculo).

Tabla 2.9: Proyección del número anual de injertos requeridos en implantes dentales hasta 2023.

Año	Población (20 a 64 años)	Nº Total Injertos	FONASA	ISAPRE	Otro
2005	10.821.316	12.174	9009	2009	1157
2006	11.009.726	12.386	9166	2044	1177
2007	11.198.319	12.598	9323	2079	1197
2008	11.387.095	12.810	9480	2114	1217
2009	11.576.053	13.023	9637	2149	1237
2010	11.765.193	13.236	9795	2184	1257
2011	11.954.516	13.449	9952	2219	1278
2012	12.144.022	13.662	10110	2254	1298
2013	12.333.709	13.875	10268	2289	1318
2014	12.523.580	14.089	10426	2325	1338
2015	12.713.632	14.303	10584	2360	1359
2016	12.903.868	14.517	10742	2395	1379
2017	13.094.285	14.731	10901	2431	1399
2018	13.284.885	14.945	11060	2466	1420
2019	13.475.668	15.160	11218	2501	1440
2020	13.666.633	15.375	11377	2537	1461
2021	13.857.781	15.590	11537	2572	1481
2022	14.049.111	15.805	11696	2608	1501
2023	14.240.623	16.021	11855	2643	1522

Escenario Pesimista

En este caso, se repite nuevamente el criterio utilizado en el caso de ALIF y OTF, optándose por omitir los casos FONASA y abarcar un 15% del total de implantes estimados en el caso de la previsión por ISAPRE y un 5% para el caso de otras previsiones. Esto entrega un promedio de 416 injertos en implantes dentales por año, hasta el 2023 (ver Figura 2.13).

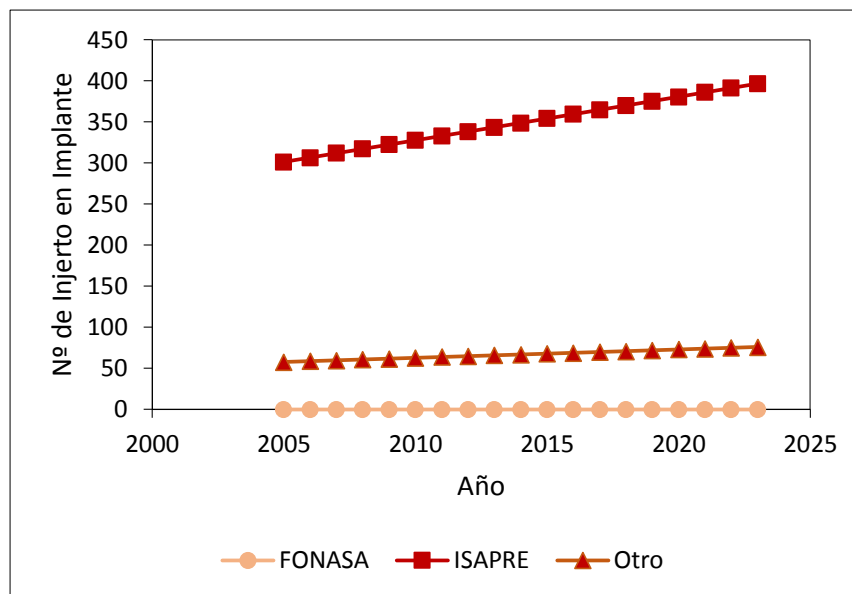


Figura 2.13: Proyección de injertos orales bajo escenario pesimista. No se consideran casos FONASA y se pretende abarcar un 15% de los casos ISAPRE y un 5% de otro tipo de previsión.

Escenario Optimista

Para el caso optimista, considera que los casos FONASA corresponden a un 10% de los 1500 implantes del plan y un 10% de los casos FONASA que podrían existir fuera de ese plan y corresponder a los tramos C y D de este sistema de previsión. Además se considera abarcar un 40% de ISAPRE, debido a que la tendencia a invertir en este uso puede que no sea tan grande como en los casos más graves de ALIF y OTF; y un 15% de otras previsiones. Esto entrega alrededor de 3.067 injertos en implantes dentales anualmente, hasta el 2023 (ver Figura 2.14).

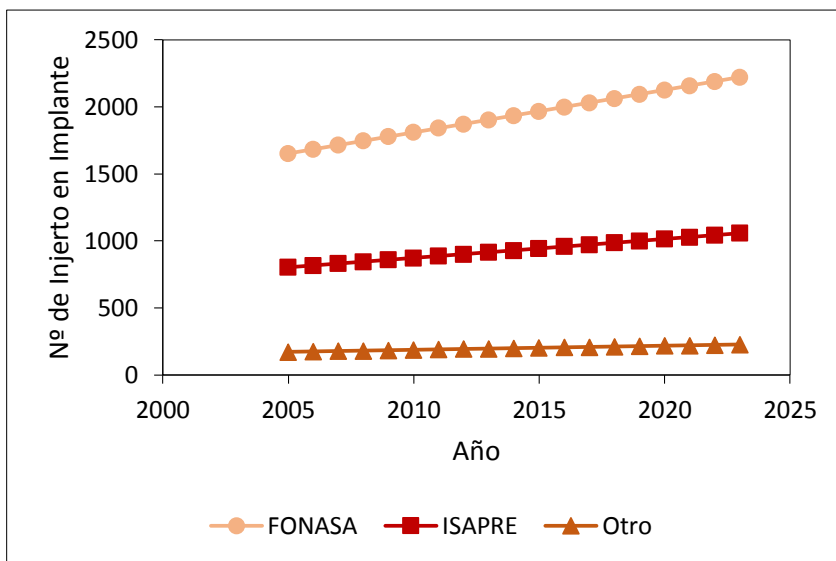


Figura 2.14: Proyección injertos orales bajo escenario optimista. Se considera el 10% casos FONASA, un 40% de los caso ISAPRE y un 15% de otro tipo de previsión.

Demanda asociada a injertos maxilofaciales

Finalmente, luego de analizar ambas perspectivas se opta por omitir procedimientos de injerto de FONASA y abarcar un 30% de los casos ISAPRE y 5% de otro tipo de previsión. Entregando un mercado de aproximadamente 764 implantes que requieren injerto anualmente (ver Figura 2.15).

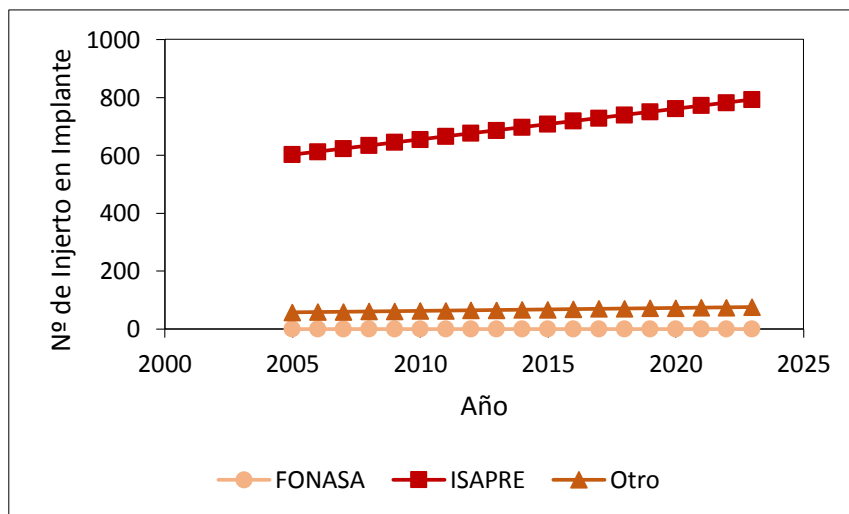


Figura 2.15: Proyección injertos orales realista. Se omiten los casos FONASA y se considera un 30% de los casos ISAPRE y 5% de otro tipo de previsión.

Resumen demanda chilena

Finalmente los casos que definen la demanda chilena de *rhBMP-2* son presentados en la Tabla 2.10 en la que se presenta la cantidad de casos promedio de la proyección de las aplicaciones autorizadas por la FDA para *rhBMP-2* y se indica el porcentaje respecto al total de cada caso que representa la demanda escogida.

Tabla 2.10: Resumen de la demanda chilena anual promedio.

Aplicación	Nº de Casos	Parte del total de casos
		[%]
ALIF	20,6 ± 0,8	9,86
OTF	23,8 ± 0,9	7,55
Injertos Orales	810,8 ± 38,6	5,43

2.3.2 Demanda en el Exterior

Dado que el mercado chileno es bastante pequeño, se analiza la posibilidad de ampliar el alcance del producto de este proyecto a nivel internacional, dentro de los países más cercanos geográficamente. Se ha reportado que las exportaciones de la industria médica chilena aún poseen una baja participación, pero ha mostrado un crecimiento sostenido en los últimos años, a tasas promedio de un 12% con tendencia creciente; dentro de estas exportaciones farmacéuticas, los destinos más representativos son Ecuador, Perú y Bolivia (Vassallo, 2010). De acuerdo a lo anterior, se estudiarán estos tres países como posibles mercados; y además, aunque Argentina cuenta con una sucursal de Medtronic Inc., la idea de este proyecto es generar un producto competitivo en términos de calidad y precio, por lo que se incluirá también como alternativa de análisis al mercado argentino.

Se procederá a realizar el mismo cálculo cruzado, basado en la población de cada país y los índices internacionales ya utilizados, para estimar la posible demanda exterior. Para definir más o menos las características socioeconómicas de cada país y así caracterizar de forma preliminar el mercado demandante disponible, se procedió a analizar el producto interno bruto (PIB) per cápita de cada uno de ellos (ver Tabla 2.11). De esta forma, se establece que, dado que presentan índices menores al chileno, Bolivia, Perú y Ecuador, se abordarán considerando el caso pesimista aplicado en Chile que corresponde a abarcar un 3,78% de todos los casos de ALIF y OTF grado IIIA y IIIB; y un 2,95% de todos

los implantes que requieren injerto. Mientras que en el caso de Argentina, teniendo en cuenta que el indicador per cápita PIB, se puede considerar un caso similar al chileno, se decide aplicar el mismo criterio, es decir, abarcar el 9,86% de todos los procedimientos ALIF; 7,55% de todas las OTF grado IIIA y IIIB; y finalmente 5,43% de todos los injertos orales. El detalle anual de cada país bajo escenario de demanda escogido en cada se puede ver en el Apéndice A.2

Tabla 2.11: PIB per cápita y población de los países de demanda exterior. Datos de (International Monetary Fund , 2013).

Año	2010		2011		2012	
País	PIB Per Cápita [\$USD]	Población [Millones]	PIB Per Cápita [\$USD]	Población [Millones]	PIB Per Cápita [\$USD]	Población [Millones]
Argentina	9.162,302	40.117	10.959,082	40.570	11.576,212	41.028
Bolivia	1.897,729	10.426	2.269,352	10.629	2.532,483	10.831
Chile	12.712,541	17.094	14.551,690	17.248	15.410,116	17.403
Ecuador	4.310,108	14.792	4.864,980	15.014	5.310,629	15.239
Perú	5.207,299	29.552	5.947,635	30.009	6.530,333	30.474

Bolivia

Desde el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) de Bolivia, se obtiene la proyección de la población entre 20 y 64 años hasta el año 2010 (ver Figura 2.16), con la que, una vez obtenida la ecuación de tendencia de forma análoga a la Ec. 1, se realizará la proyección hasta el año 2023.

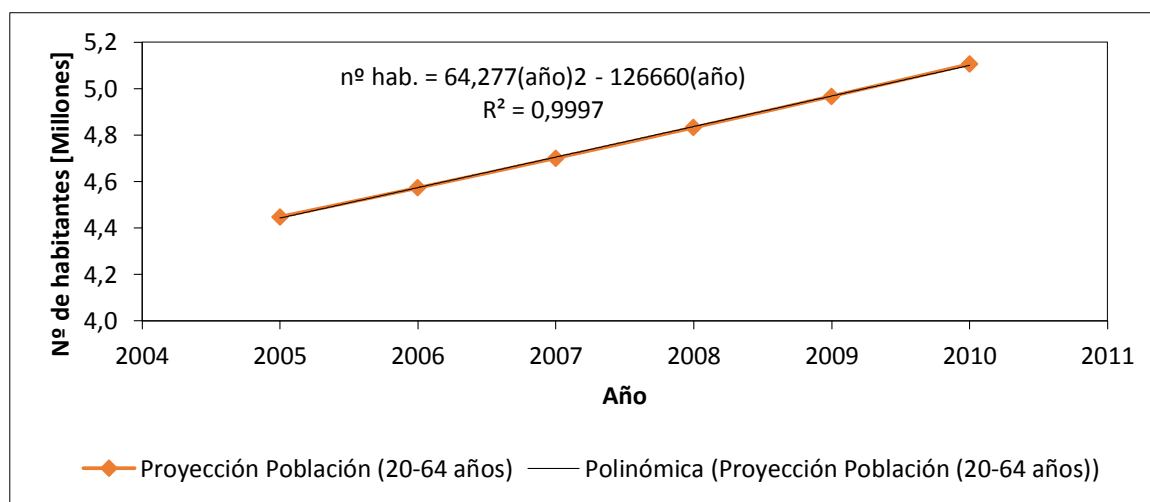


Figura 2.16: Proyección población boliviana entre 20 y 64 años. De acuerdo a esta proyección, se determina la línea de tendencia para realizar la proyección desde el año 2010 a 2023. Datos desde (INE Bolivia, 2001).

De acuerdo a las proyecciones de la población boliviana (entre 20 y 64 años) y los porcentajes mencionados al inicio de esta subsección, se determina la cantidad promedio de ALIF, OTF e injertos de implantes dentales para Bolivia que podrían utilizar *rhBMP-2* como tratamiento al año 2023 (ver Tabla 2.17).

Tabla 2.12: Demanda promedio en Bolivia.

Aplicación	Nº de Casos	Parte del total de casos [%]
ALIF	$4,3 \pm 0,3$	3,78
OTF	$6,5 \pm 0,5$	3,78
Injertos Orales	$128,7 \pm 9,1$	2,95

Perú

De igual manera, en base a proyecciones para el año 2015 del Instituto Nacional de Estadísticas e Informática (INEI) peruano, respecto a la población entre 20 y 64 años (ver Figura 2.17), se procede a determinar la ecuación de tendencia y proyectar hasta el año 2023.

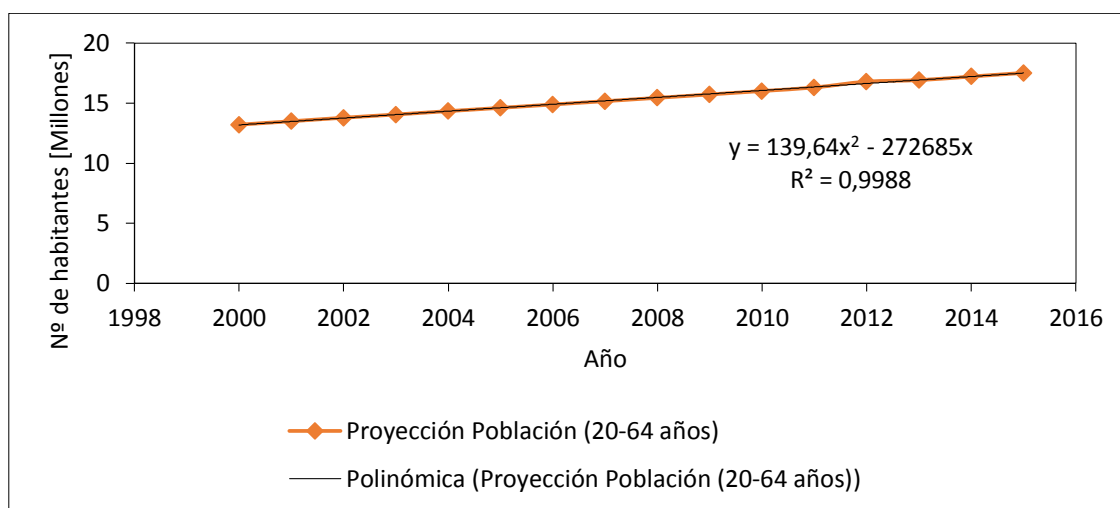


Figura 2.17: Proyección población peruana entre 20 y 64 años. De acuerdo a esta proyección, se determina la línea de tendencia para realizar la proyección desde el año 2010 a 2023. Datos desde (INEI Perú, 2010).

Una vez realizada la proyección se procede a definir la cantidad total promedio de casos en los que se utilizaría *rhBMP-2* al año 2023 (ver Tabla 2.13).

Tabla 2.13: Demanda promedio en Perú.

Aplicación	Nº de Casos	Parte del total de casos
		[%]
ALIF	12,9 ± 0,7	3,78
OTF	19,4 ± 1,0	3,78
Injertos Orales	381,3 ± 20,0	2,95

Ecuador

Al no contar con los datos exactos distribuidos por edad, como en los casos anteriores, se decidió tomar un promedio del porcentaje que representa este grupo etario en porcentaje respecto a la población total de los países Bolivia (49,96%), Perú (75,71%) y Chile (60,29%). Este cálculo entregó que el 61,99% de la población ecuatoriana debiera tener entre los 20 y 64 años de edad; lo que unido a la proyección de población total del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) de este país (ver Figura 2.18) y los índices internacionales utilizados entrega la cantidad promedio de ALIF, OTF grados IIIA y IIIB, y los injertos de implante total a abarcar por proteína *rhBMP-2* hasta el año 2023 (ver Tabla 2.14).

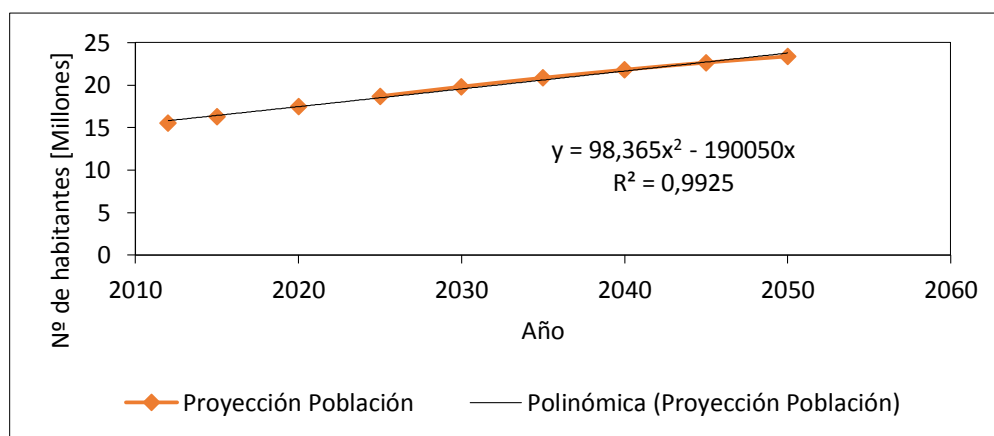


Figura 2.18: Proyección población ecuatoriana total. De acuerdo a esta proyección, se determina la línea de tendencia para realizar la proyección desde el año 2010 a 2023. Datos desde (INEC Ecuador, 2010).

Tabla 2.14: Demanda promedio en Ecuador.

Aplicación	Nº de Casos	Parte del total de casos [%]
ALIF	$7,4 \pm 0,3$	3,78
OTF	$11,2 \pm 0,4$	3,78
Injertos Orales	$219,3 \pm 8,8$	2,95

Argentina

En este caso, los datos entregados por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) de Argentina sólo corresponden a los años 2001, 2005, 2010 y 2015, por lo que con esos cuatro años la ecuación que se podría obtener implicaría un error un poco mayor (INEC Argentina, 2005). Así, por otro lado el International Monetary Fund (IMF) provee los datos de población y una proyección hasta el año 2018 (ver Figura 2.19); de esa forma se decide realizar la misma estimación que en el caso ecuatoriano, proyectar a partir de la población total y definir que un 61,99% de la población total perteneciente al grupo etario de 20 a 64 años.

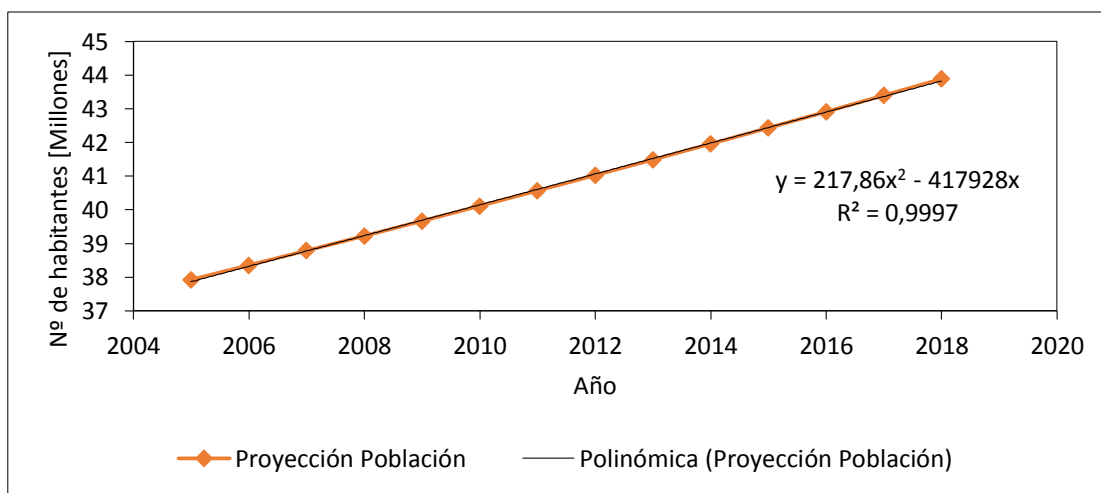


Figura 2.19: Proyección población argentina total. De acuerdo a esta proyección, se determina la línea de tendencia para realizar la proyección desde el año 2010 a 2023. Datos desde (International Monetary Fund , 2013).

Así, junto con los índices internacionales y considerando un caso similar al chileno, se obtiene la cantidad promedio de casos totales que se estima podrían utilizar *rhBMP-2* al año 2023 (ver Tabla 2.15).

Tabla 2.15: Demanda promedio en Argentina.

Aplicación	Nº de Casos	Parte del total de casos [%]
ALIF	49,8 ± 1,7	9,86
OTF	57,4 ± 2,0	7,55
Injertos Orales	1036,1 ± 36,2	5,43

2.4 ANÁLISIS DE PRECIOS Y COMERCIALIZACIÓN DEL PRODUCTO

En Chile, los impuestos al comercio exterior corresponden a derechos específicos y/o *ad valorem* (según lo establecido por el Arancel Aduanero) y gravan con una tasa única de 6% sobre el valor CIF (Costo, seguro y flete) (Aduanas Chile, 2010) de la importación de cualquier mercadería (Vassallo, 2010). Por otro lado, además de los derechos de aduana, la mercadería debe pagar IVA a una tasa del 19% (Servicio de Impuestos Internos [SII], s.f.), teniendo como base imponible el mismo valor CIF de la mercadería más los derechos de aduana (al tratarse de importaciones); no existiendo gravámenes adicionales para el caso de medicamentos (Vassallo, 2010). Aplicando estos impuestos al caso del kit S InFuse® (4,2 mg de *rhBMP-2*), considerando el valor de US\$1.870.- con el que ingresaría al país (según datos de aduana); significaría que por el simple hecho de ingresar al país, ya se deben costear alrededor de \$225.935.- que finalmente son traspasados al consumidor dentro del valor de venta final del producto.

Tal como se ha mencionado antes en este capítulo, al tratarse de un medicamento de internación, la venta no se realizaría directamente a los pacientes, sino que sería adquirida por los establecimientos hospitalarios y/o clínicos. De esta forma, para el caso de los establecimientos de salud privados, la comercialización sería de forma particular; mientras que para el caso de los establecimientos públicos, la comercialización se llevaría a cabo a través de la Central Nacional de Abastecimiento (CENABAST), organismo encargado del abastecimiento de fármacos y dispositivos médicos a este tipo de establecimientos.

2.5 UBICACIÓN Y CAPACIDAD DE LA PLANTA

Respecto a la ubicación de la planta, dada la envergadura de este proyecto, se considera la implementación del proceso en un laboratorio farmacéutico ya establecido en Chile, lo más probable es que ésta se ubique en Santiago o en algún sector central. De esta forma sólo implica el costo por instalación y puesta en marcha del proceso, ahorrando los gastos asociados a la formación de una nueva empresa, distribución administrativa y compra de algunos equipos (la empresa puede poseer de forma previa algunos equipos que pudieran requerirse).

Por otro lado, para definir la capacidad productiva de la planta, se considera la demanda de la proteína, lo que significaría contabilizar el total de casos de ALIF, OTF e implantes dentales que requieren injerto.

Antes definir la capacidad de la planta, es importante mencionar que debido a la aparición de informes, publicaciones y demandas contra Medtronic Inc. que dejaban en tela de juicio la veracidad de los estudios clínicos presentados por la empresa y la calidad, efectividad e inocuidad de este producto en la aplicación en columnas (ALIF); en 2011 Medtronic Inc. patrocinó a la Universidad de Yale bajo el proyecto de acceso a datos abiertos de Yale (YODA), para la realización de un estudio de dos años de duración en el que se revisara y verificara toda la información acerca de la efectividad y seguridad de Infuse® aplicado específicamente en ALIF (Krumholz *et al.*, 2013). Luego de dos años de estudio, en los que la Universidad de Yale solicitó la asesoría de expertos de la Universidad de la Salud & Ciencias de Oregon (OHSU) y de la Universidad de York en Reino Unido, en julio del presente año se publicaron los resultados y conclusiones de esta revisión. En estas publicaciones se concluye, a grandes rasgos, que la aplicación de Infuse® en columna no presenta ventajas significativas por sobre el tratamiento tradicional: no hay diferencias significativas en la duración de la hospitalización ni en la aplicación de analgésicos en el período de recuperación, existe un aumento de riesgos de artritis, bursitis, eventos neurológicos, entre otros; sí existe un incremento en la velocidad de fusión, sin embargo la reducción de dolor es insignificante e incluso aumentan los dolores postquirúrgicos en comparación con el autoinjerto, lo que implica que una fusión exitosa no se correlacionaría con una reducción del dolor, esto entre muchas otras observaciones realizadas (Fu *et al.*, 2013a) (Fu *et al.*, 2013b) (Simmonds *et al.*, 2013) (Brown *et al.*, 2013).

De esta manera y considerando los resultados entregados por los informes mencionados, se decide descartar la aplicación de *rhBMP-2* en columna, limitando el mercado y la demanda sólo a las aplicaciones OTF e implantes dentales.

Una vez resuelto el mercado objetivo, para determinar la cantidad de proteína producir se debe conocer la dosis para cada aplicación. Se sabe que la concentración de proteína aprobada para el uso es de 1,5 [mg/ml] y pero las cantidades de *rhBMP-2* dependen de la aplicación, por ejemplo, para OTF la dosis típicamente es de 12 mg (Tressler *et al.*, 2011). Para el caso de los injertos orales, no se tiene un dato bibliográfico acerca de la cantidad de proteína utilizada; sin embargo se sabe que Medtronic Inc. produce el kit más pequeño (XXS) de 1,05 mg para uso dental, por lo que se utilizará esa cantidad como referencia para tratar las elevaciones de seno maxilar y aumentos alveolares en injerto orales. Con los datos anteriores se calcula la cantidad de *rhBMP-2* necesaria para suplir la totalidad de la demanda y de ella se pretende abarcar el 35%. Entonces, considerando el aumento de la demanda en el plazo establecido para la proyección (10 años) (ver Tabla 2.16), se decide diseñar la planta con el fin de suplir el 35% de la demanda total del año 2023, es decir, 1537 [mg] (se utilizan los datos presentados en el Apéndice A.2). La producción anual y su función respecto a la capacidad total de la planta son presentadas en el Capítulo 6.

Tabla 2.16: Demanda anual total y demanda a suplir.

Año	Demanda Anual					Demanda a Cubrir
	Casos Totales Anuales		Proteína Total [mg]			Producción Proteína [mg]
	OTF	Implantes	OTF	Implantes	Total	
2013	111	2406	1332,0	2525,8	3857,8	1350,2
2014	112	2439	1349,5	2561,3	3910,8	1368,8
2015	114	2473	1367,0	2596,9	3963,9	1387,4
2016	115	2507	1384,5	2632,5	4017,0	1405,9
2017	117	2541	1402,0	2668,2	4070,2	1424,6
2018	118	2575	1419,5	2703,8	4123,4	1443,2
2019	120	2609	1437,1	2739,6	4176,6	1461,8
2020	121	2643	1454,7	2775,3	4230,0	1480,5
2021	123	2677	1472,3	2811,1	4283,3	1499,2
2022	124	2711	1489,9	2846,9	4336,8	1517,9
2023	126	2745	1507,5	2882,7	4390,2	1536,6

2.6 CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO DE MERCADO

Para finalizar el análisis de mercado de la *rhBMP-2*, bajo el contexto de la nula producción de biofármacos en Chile, se destaca lo pequeño del mercado nacional, en el que el alto valor del producto ofrecido por la competencia determina definitivamente el bajo consumo actual del mismo. Lo anterior, adicionado a la especificidad de los problemas de salud en los que se permite el uso de *rhBMP-2*, implica que el mercado actual sea más bien inexistente.

De acuerdo a las proyecciones realizadas, apostando por criterios conservadores respecto a la envergadura de esta demanda y consideración de los diversos sistemas previsionales, junto con la adición de países que históricamente importan productos farmacológicos desde Chile (Bolivia, Perú y Ecuador), así como también incursionando en un mercado establecido como el argentino, se puede alcanzar un mercado bastante consistente (considerando el contexto de desarrollo) de 2.703 casos de aplicación. Se concluye además que este mercado iría en aumento según indica la demografía (tendencia envejecimiento de la población), dado el grupo etario al que se le aplica (de 20 a 65 años). Así, desde el punto de vista de la demanda y considerando resultaría conveniente instalar una planta de este tipo; sin embargo, dado que de todas maneras a través de este análisis de mercado, se establece que se trata de un mercado pequeño, se requiere la evaluación económica para determinar la conveniencia real.

Se recomienda de todas formas realizar un estudio económico en los países mencionados respecto beneficios reales que implicaría el tratamiento con *rhBMP-2* (considerando ingresos por día de trabajo, planes de reembolso por sistemas previsionales de salud, etc.), para fundamentar su uso de forma más cercana a la realidad socioeconómica de cada uno de ellos.

2.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 2

- AAOMS. (2005 - 2013). *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. Recuperado el June de 2013, de Sitio web de AAOMS: http://www.aaoms.org/dental_implants.php
- AAOMS. (2008 - 2013). *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. Recuperado el June de 2013, de Sitio web de AAOMS: The Oral and Maxillofacial Surgeon: <http://www.aaoms.org/theoms.php>
- Acosta, F., Serrano, D., Rodríguez, J., & Lizán, L. (2008). Evaluación económica de la rhBMP-2 (Inductos) en el tratamiento de la fusión vertebral para la lumbagia crónica en España. *PharmaoEconomics - Spanish Research Articles*, 5(4), 109 - 118.
- Aduanas Chile. (2010). *EL Servicio Nacional de Aduanas: Facilitando el comercio internacional de Chile y protegiendo nuestras fronteras*. Chile.
- Alt, V., Chhabra, A., Franke, J., Cuhe, M., Schnettler, R., & Huec, J.-C. L. (2009). An economic analysis of using rhBMP-2 for lumbar fusion in Germany, France and UK from societal perspective. *Eur. Spine J.*(18), 800 - 806.
- Alt, V., Donell, S., Chhabra, A., Bentley, A., Eicher, A., & Schnettler, R. (2009). A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo-Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. *Injury Int. J. Care Injured*, 40, 1269 - 1275.
- Asociación Chilena de Seguridad [ACHS]. (2012). Obtenido de Sitio web de ACHS: Estadísticas: <http://www.achs.cl/portal/ACHS-Corporativo/Paginas/Estadisticas.aspx#>
- Bhandari, M., Guyatt, G., Swiontkowski, M., & Schemitsch, E. (2001). Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 83-B, 62 - 68.
- Boden, S. D. (2002). Overview of the Biology of Lumbar Spine Fusion and Principles for Selecting a Bone Graft Substitute. *SPINE*, 27(16S), S26 - S31.
- Bray, H. (2008). *2006-based national population projections for the UK and constituent countries*. Office National Statistics.
- Brown, J. E., Heirs, M. K., Higgins, J. P., Mannion, R. J., Seneschall, C. C., Simmonds, M. C., . . . Wright, K. (2013). *Systematic review and meta-analysis of the safety and efficacy of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for spinal fusion*. University of York, Centre for Reviews and Dissemination (CRD).
- Burkus, J., Transfeldt, E., Kitchel, S., Watkins, R., & Balderston, R. (2002). Clinical and Radiographic Outcomes of Anterior Lumbar Interbody Fusion Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *SPINE*, 27(21), 2396 - 2408.

- Carragee, E., Hurwitz, E., & Weiner, B. (2011). A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *The Spine Journal*(11), 471 - 491.
- Claudle, R. T., & Stern, P. J. (July de 1987). Severe Open Fractures of the Tibia. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 69-A(6), 801 - 807.
- Clínica Alemana. (2010). *Traumatología y Ortopedia: Anuario 2010*. Anuario, Clínica Alemana, Traumatología y Ortopedia.
- Clínicas de Chile A.G. (2012). *Dimensionamiento del sector de salud privado en Chile*. Clínicas de Chile A.G.
- Court-Brown, C., Cross, A., Hahn, D., Marsh, D., Willett, K., Quaba, A., . . . Watson, J. (1997). *A Report by de BOA/BAPS Working Party on The Management of Open Tibial Fractures*. British Orthopaedic Association and British Association of Plastic Surgeons.
- Food and Drug Administration. (7 de October de 2001). Center for Devices and Radiological Health. *H010002: OP-1 Implant*. Rockville, Maryland, USA.
- Food and Drug Administration. (2 de July de 2002). Center for Devices and Radiological Health. *P000058: InFUSE Bone Graft/LT-CAGE Lumbar Tapered Fusion Device*. Rockville, Maryland, USA.
- Food and Drug Administration. (30 de April de 2004). Center for Devices and Radiological Health. *P000054: INFUSE Bone Graft*. Rockville, Maryland, USA.
- Food and Drug Administration. (7 de April de 2004). Center for Devices and Radiological Health. *H020008: OP-1 Putty*. Rockville, Maryland, USA.
- Food and Drug Administration. (9 de March de 2007). Center for Devices and Radiological Health. *P050053: InFuse Bone Graft*. Rockville, Maryland, USA.
- Fu, R., Selph, S., McDonagh, M., Peterson, K., Tiwari, A., Chou, R., & Helfand, M. (June de 2013). Effectiveness and Harms of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Spine Fusion. *Ann. Intern. Med.*, 158, 890 - 902.
- Fu, R., Selph, S., McDonagh, M., Peterson, K., Tiwari, A., Chou, R., & Helfand, M. (2013). *Effectiveness and Harms of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in Spine Fusion: A Systematic Review and Meta-analysis*. Oregon Health & Science University, School of Medicine, Department of Medical Informatics & Clinical Epidemiology, Portland.
- Fuentes, R., Weber, B., Flores, T., & Oporto, G. (2010). Uso de Profilaxis Antibiótica en Implantes Dentales: Revisión de la Literatura. *Int. J. Odontostomat.*, 4(1), 5 - 8.
- Garrison, K., Donell, S., Ryder, J., Shemilt, I., Mugford, M., Harvey, I., & Song, F. (2007). Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technology Assessment*, 11(30).

- Garrison, K., I. Shemilt, S. D., Ryder, J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., & Alt, V. (2010). Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults (Review). (6), 2, 157. (T. C. Library, Recopilador) The Cochrane Collaboration.
- Giannoudis, P., Papakostidis, C., & Roberts, C. (March de 2006). A review of the management of open fractures of the tibia and femur. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 88-B(3), 281 - 289 .
- Gobierno de Chile. (6 de Junio de 2012). Recuperado el 18 de Junio de 2013, de Sitio web de FONASA: Noticias: http://www.fonasa.cl/wps/wcm/connect/internet/SA-General/Informacion%20Corporativa/Historial%20de%20Noticias/Noticias%202012/Junio/Noticia_20120607
- Goel, V., Sairyo, K., Vishnubhotla, S., Biyani, A., & Ebraheim, N. (2006). Spine Disorders: Implications for Bioengineers. En S. M. Kurtz, & A. A. Edidin, *Spine Technology Handbook* (págs. 145 - 172). Elsevier Inc.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H., & Valentin-Opran, A. (December de 2002). Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Treatment of Open Tibial Fractures. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 84-A(12), 2123 - 2134.
- Gustilo, R., & Anderson, J. (June de 1976). Prevention of Infection in the Treatment of One Thousand and Twenty-five Open Fractures of Long Bones. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 58-A(4), 453 - 458.
- Gustilo, R., Mendoza, R., & Williams, D. (August de 1984). Problems in the Management of Type III (Severe) Open Fractures: A New Classification of Type III Open Fractures. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 24(8).
- iData Research Inc. (2013). *U.S. Market for Dental Bone Graft Substitutes and Other Biomaterials*. Vancouver: iData Research Inc.
- IFHP. (2013). *International Federation of Health Plans: 2012 Comparative Price Report, Variation in Medical and Hospital Prices by Country*.
- INE Bolivia. (2001). *Instituto Nacional de Estadísticas (INE) de Bolivia*. Recuperado el 2013, de <http://www.ine.gob.bo/indice/visualizador.aspx?ah=PC20410.HTM>
- INEC Argentina. (2005). *Proyecciones provinciales de población por sexo y grupo de edad 2001-2005*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC).
- INEC Ecuador. (2010). *¿Cómo crecerá la población en Ecuador?* Instituto Nacional de Estadística y Censos de Ecuador.
- INEI Perú. (2010). *Perú: Estimaciones y proyecciones de Población Económicamente Activa, Urbana y Rural por Sexo y Grupos de Edad, según Departamento, 2000-2015*. Instituto Nacional de Estadísticas e Informática del Perú, Dirección Técnica de Demografía e Indicadores Sociales.

- Instituto Nacional de Estadísticas. (2013). *Censo 2012*. Recuperado el Junio de 2013, de <http://www.censo.cl/>
- International Monetary Fund . (April de 2013). *International Monetary Fund (IMF)*. Recuperado el June de 2013, de <http://www.imf.org/external/pubs/ft/weo/2013/01/weodata/WEOApr2013all.xls>
- Krumholz, H. M., Ross, J. S., Gross, C. P., Emanuel, E. J., Hodshon, B., Ritchie, J. D., . . . Lehman, R. (18 de June de 2013). A Historic Moment fo Open Science: The Yale University Open Data Access Project and Medtronic. *Annals of Internal Medicine*, 158(12).
- Kutz, S., & Edidin, A. (2006). The Basic Tools and Terminology of Spine Treatment. En S. M. Kutz, & A. A. Edidin, *Spine Technology Handbook* (págs. 1 - 9). Elsevier Inc.
- Ley 19.039. (1991). Historia de la Ley, Nº 19.039: Establece normas aplicables a los privilegios Industriales y protección de los derechos de propiedad Industrial.
- Littenberg, B., Weinstein, L., McCarren, M., Mead, T., Swiontkowski, M., Rudicel, S., & Heck, D. (1998). Closed Fractures of the Tibial Shaft: A Meta-Analysis of Three Methods of Treatment. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 80-A(2), 174 - 183.
- McKay, B., Peckham, S., & Scifert, J. (2006). Biologis to Promote Spinal Fusion. En S. M. Kurtz, & A. A. Edidin, *Spine Technology Handbook* (págs. 241 - 279). Elsevier Inc.
- Medtronic Inc. (29 de January de 2013). *Medtronic*. Recuperado el Juny de 2013, de http://www.medtronic.com/about-us/company-profile/locations/index.htm?loc=MDTHomeRefresh_B_InPage_Footer_About1
- Medtronic INFUSE Bone Graft*. (2013). (M. Inc, Productor) Recuperado el 23 de Junio de 2013, de <http://facts.infusebonegraft.com/>
- Ministerio de Salud de Chile, DEIS. (2010). Recuperado el Mayo de 2013, de Sitio web de DEIS: Población: <http://www.deis.cl/estadisticas-poblacion/#>
- Ministerio de Salud de Chile, DEIS. (2010). Recuperado el Junio de 2013, de Sitio web de DEIS: Atenciones Odontológicas: <http://intradeis.minsal.cl/reportesremesas/2010/Odonto02/Odonto02.aspx>
- Ministerio de Salud de Chile; DEIS. (2006 - 2010). Obtenido de Sitio web DEIS: Menú Egresos Hospotalarios: http://intradeis.minsal.cl/egresoshospitalarios/menu_publica_nueva/menu_publica_nueva.htm
- Ministerio de Salud de Chile; DEIS. (2008 - 2010). Obtenido de Sitio web de DEIS: Intervenciones Quirúrgicas: http://intradeis.minsal.cl/reportesremesas/menu_publica/Menu_inter_quirurgicas/Tree_2009.aspx

- Ministerio de Salud de Chile; DEIS. (2010). Obtenido de Sitio web de DEIS: Atenciones Médicas: http://intradeis.minsal.cl/reportesremesas/menu_publica/Menu_aten_med/Tree_2009.aspx
- Ministerio de Salud; Pontificia Universidad Católica Stgo; Universidad Alberto Hurtado. (2011). *Encuesta Nacional de Salud ENS Chile 2009-2010: Tomo II*.
- MINSAL; INE. (2000). Primera Encuesta Nacional de Calidad de Vida y Salud. *Presencia de Enfermedades Crónicas, Agudas, Accidentes, Discapacidad, Dolor Crónico en los Chilenos, Uso de Métodos de Planificación Familiar*. Chile.
- Moore, J. (1 de July de 2009). *Star Tribune Buisness*. Recuperado el June de 2013, de <http://www.startribune.com/business/49557847.html>
- Muñoz, M., & Trullen, A. (2008). Comparación entre distintos sustitutos óseos utilizados para procedimientos de elevación de seno maxilar previo a la colocación de implantes dentales. *Av. Periodon. Implantol.*, 20(3), 155 - 164.
- Narváez, C. (2009). Biogénicos: Un Estudio de Vigilancia Tecnológica para el Caso de la Situación en Chile. *J. Technol. Manag. Innov.*, 4(3), 59 - 73.
- Olson Jr., S., Lyons, C., & Nuez, J. (21 de June de 2007). *Estados Unidos, Patente nº US 2007/0142916 A1*.
- Oporto, G., Fuentes, R., Álvarez, H., & Borie, E. (2008). Recuperación de la Morfología y Fisiología Maxilo Mandibular: Biomateriales en Regeneración Ósea. *Int. J. Morphol.*, 26(4), 853 - 859.
- O'Reilly, S. (November de 2011). Beyond INFUSE: Sine Community Searches For Answers, Alternatives. *Elsevier Business Intelligence: In Vivo*, 29(10).
- Palmer, K., Walsh, K., Bendall, H., Cooper, C., & Coggon, D. (10 de June de 2000). Back Pain in Britain: comparison of two prevalence surveys at an interval of 10 years. *BMJ*, 320, 1577 - 1578.
- Schmidmaier, G., Schwabe, P., Wlldemann, B., & Haas, N. (2007). Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury Int. J. Care Injured*, 38S4, S35 - S41.
- Servicio de Impuestos Internos. (s.f.). *Impuesto al Valor Agregado (IVA)*. Recuperado el Junio de 2013, de Sitio Web: Servicio de Impuestos Internos (SII): http://www.sii.cl/portales/inversionistas/imp_chile/impuestos_iva.htm
- Sieber, C., Schwaerzer, G., & Knaus, P. (2009). Bone morphogenetic protein signaling is fine-tuned on multiple levels. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphigenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics* (págs. 81 - 114). Birkhäuser.
- Simmonds, M. C., Brown, J. V., Heirs, M. K., Higgins, J. P., Mannion, R. J., Rogers, M. A., & Stewart, L. A. (June de 2013). Safety and Effectiveness of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Spinal Fusion. *Ann. Intern. Med*, 158, 877- 889.

- Spagnoli, D. (2009). The application of recombinant human bone morphogenetic protein on absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) to reconstruction of maxillofacial bone defects. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systematic Therapeutics* (págs. 43 - 70). Birkhäuser.
- Straumann. (2012). *Annual Report 2012: Stepping Into Tomorrow's World*. Straumann Group.
- Suk, M. (2009). Use of recombinant human BMP-2 in orthopedic trauma. En S. Vukicevic, & K. Sampath, *Bone Morphogenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics* (págs. 25 - 42). Birkhäuser.
- The Black Letter. (2011). The Treatment of Back Pain in The United States: The \$34 Billion Solution. (S. W. Wiesel, Ed.) *The Black Letter*, 26(11), 121 - 132.
- The Organisation for Economic Co-operation and Development. (2011). *Health at a Glance 2011: OECD Indicators*. OECD, Secretary-General of the OECD. OECD Publishing.
- Tobar, J., Cabrera, S., Nuñez, P., Vassallo, C., Guerrero, J. L., & Ríos, M. (2012). *Mercado de la Salud Privada en Chile*. Estudio solicitado por Fiscalía Nacional Económica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Tressler, M., Richards, J., Sofianos, D., Comrie, F., Kregor, P., & Obrebsky, W. (2011). Bone Morphogenetic Protein-2 Compared to Autologous Iliac Crest Bone Graft in the Treatment of Long Bone Nonunion. *Orthopedics*, 34(12), e877 - e884.
- Tzioupis, C., & Giannoudis, P. V. (2007). Prevalence of long-bone non-unions. *Injury Int. J. Care Injured*, 38S, S3 - S9.
- U.S. Department of Commerce. (8 de December de 2011). *United States Census Bureau*. Recuperado el June de 2013, de http://www.census.gov/popest/data/historical/2000s/vintage_2008/index.html
- Vassallo, C. (2010). *El mercado de medicamentos en Chile: caracterización y recomendaciones para la regulación económica*. Consultoría para la Dirección de Economía de la Salud del MINSAL.
- Wang, E. A., Wozney, J. M., & Rosen, V. (8 de April de 1997). *Estados Unidos, Patente nº 5.618.924*.
- Wang, E. A., Wozney, J. M., & Rosen, V. A. (20 de May de 1997). *Estados Unidos, Patente nº 5.631.142*.
- WHO-World Health Organization. (2011). *Definition of Active Pharmaceutical Ingredient*. World Health Organization (WHO).
- Wozney, J. (2002). Overview of Bone Morphogenetic Proteins. *SPINE*, 27(16S), S2 - S8.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS

3.1 ESQUEMA DE PRODUCCIÓN

El proceso de producción de una proteína recombinante de uso terapéutico consta de cuatro etapas fundamentales que consisten en las etapas de Propagación, Producción, Recuperación y Purificación, y por último la Formulación Final para generar un producto comercializable.

En la Figura 3.1 se esquematizan las etapas del proceso para llevar a cabo la producción de *rhBMP-2* en un cultivo de células CHO:

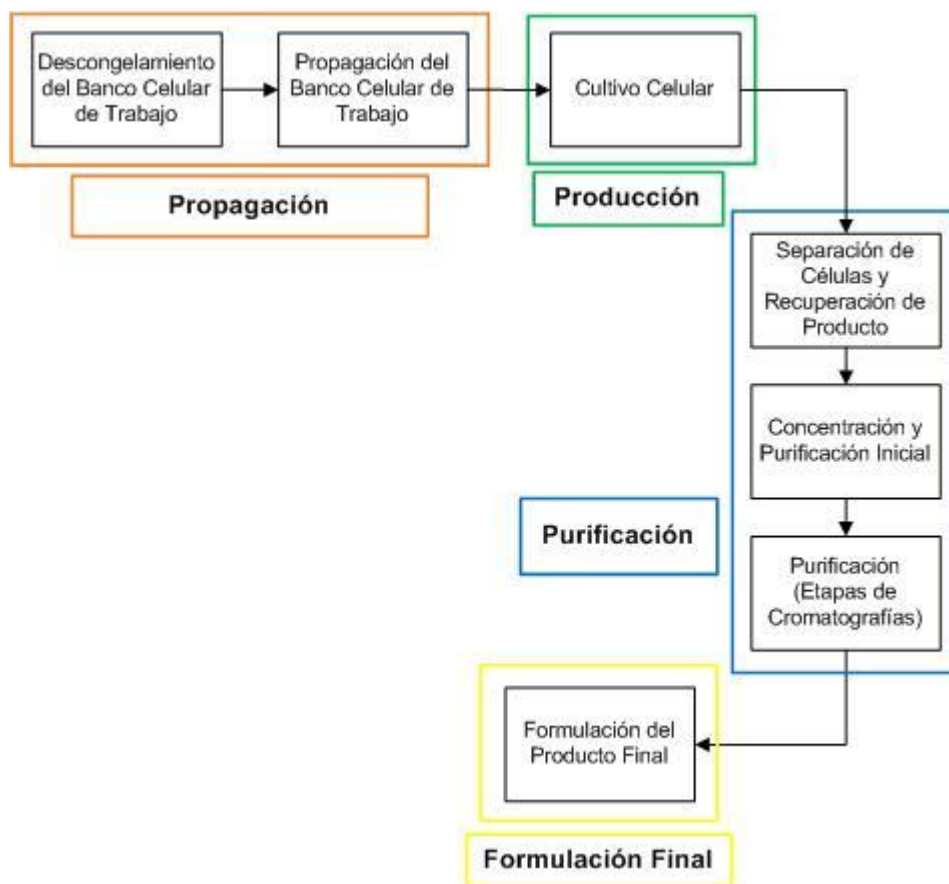


Figura 3.1. Esquema general del proceso para la producción de proteínas recombinantes.

A lo largo de este capítulo se definen las características de cada etapa, analizando las alternativas existentes para llevarlas a cabo, con el fin de seleccionar las técnicas y equipos adecuados según sus ventajas y desventajas, además de realizar una revisión general de antecedentes para determinar las características de cada sección que forma parte de cada una de las etapas mencionadas.

A continuación se detalla una etapa anterior al proceso de producción que consiste en el proceso para obtener la línea celular con la que se trabajará finalmente.

3.2 DESARROLLO DE UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE *rhBMP-2*

El primer paso para desarrollar una proteína recombinante es obtener un sistema de expresión adecuado que contenga el gen para producir la proteína de interés y adaptado a las condiciones de producción.

En vista de los alcances de este trabajo y de los antecedentes presentados en el Capítulo 1 del presente informe, el sistema de expresión a utilizar será una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), adaptada para crecer en cultivos en suspensión con medio de cultivo libre de suero animal y manipulada genéticamente para expresar el gen que codifica la proteína *rhBMP-2*.

El proceso de construcción de la línea celular que se explica a continuación debiera ser realizado en un período de 6 a 12 meses. Las características de la línea celular seleccionada para ser modificada se encuentran en el Anexo B.1.

3.2.1 Adaptación de las Células a Crecimiento en Suspensión

La adaptación de las células al crecimiento en suspensión, se basa en métodos de ensayos sucesivos en los que se parte con un cultivo de células adheridas a una superficie y se rescatan aquellas que por alguna razón se sueltan del soporte, estas células son cultivadas nuevamente y en cada cultivo la cantidad de células que se separan de la película adherida al soporte debiera aumentar, hasta que se logra obtener células capaces de mantener una viabilidad aceptable al ser cultivadas en suspensión. Posteriormente estas células se suspenden y son cultivadas para finalizar el proceso de adaptación.

3.2.2 Adaptación de las Células para Crecimiento en Medio Libre de Suero

Existen diversos protocolos para adaptar células mamíferas para crecer en medios libres de suero, sin embargo todos consisten en la realización de cultivos sucesivos en los que las concentraciones de suero animal disminuyen progresivamente (van der Valk *et al.*, 2010).

Ya sea reduciendo la proporción de suero utilizada en el medio, o realizando una adaptación secuencial, o bien una adaptación con medio condicionado, las células viables en cada etapa son seleccionadas para ser cultivadas en la siguiente con la característica común que en todos los métodos, cada etapa posee una concentración de suero animal menor que la anterior.

A modo de ejemplo, se puede realizar una adaptación secuencial iniciando el cultivo en un medio con contenido de suero animal al 10%, en la siguiente etapa se cultiva en una mezcla de 75% de medio normal y 25% de medio libre de suero, las células viables son aisladas y cultivadas nuevamente ahora en una mezcla con 50% medio normal y 50% de medio libre de suero, nuevamente se aíslan las células viables y se siguen cultivando hasta eliminar por completo la utilización de suero.

La formulación de un medio de cultivo libre de suero implica la adición de hormonas, vitaminas y otras moléculas complejas (evitando el uso de antibióticos) para asegurar la supervivencia de las células (Moraes, 2012), sin embargo realizando repetidos cultivos progresivos puede llegar a ser innecesaria la incorporación de estas moléculas o requerir concentraciones mínimas.

3.2.3 Métodos de Incorporación de ADN Exógeno

Actualmente se disponen de dos formas de incorporar DNA exógeno en una célula mamífera, que corresponden a la transfección y la infección, siendo la primera un proceso en cual el gen es introducido por métodos físicos, químicos o bioquímicos y la segunda un proceso biológico mediado por un virus (Bollati-Fogolín & Comini, 2008).

La infección es un proceso altamente eficiente en líneas celulares con receptores para el virus, ya que es el virus el que contiene integrado en su genoma un gen o una secuencia determinada, sin embargo es un proceso complicado que requiere de mayor tiempo en comparación a la transfección que resulta ser rápida, simple y requiere de pocos reactivos, y si bien su eficiencia dependerá de la línea celular, no requiere de receptores específicos, por lo que se ha convertido en el método más utilizado para la incorporación de DNA exógeno (Prieto, 2012).

Entre las técnicas más utilizadas para realizar la transfección de un gen se mencionan la co-precipitación con fosfato de calcio, el uso de polímeros catiónicos (DEAE-dextrano, PEI, entre otros), la lipofección y la electroporación (Bollati-Fogolín & Comini, 2008).

Por otro lado, es necesario incorporar un gen que otorgue o elimine alguna característica detectable, con el fin de seleccionar las colonias que fueron transfectadas exitosamente; este gen se conoce como marcador de selección.

Los marcadores de selección utilizados frecuentemente en líneas celulares mamíferas son los basados en genes de dihidrofolato reductasa (DHFR) y glutamina sintetasa (GS) que se mantienen bajo el control de promotores relativamente débiles, asociados al uso de drogas como el metotrexato (MTX) y metionina sulfoximina (MSX) (Zhang, 2010).

Las drogas MTX y MSX son antimetabolitos que inhiben la acción de las enzimas DHFR y GS respectivamente, por lo que sólo aquellas células que posean una sobreexpresión de estas enzimas podrán sobrevivir en un medio donde el antimetabolito esté presente. Luego de la transfección con los vectores de expresión que contienen los genes de expresión para la proteína de interés y los marcadores de selección, las células son seleccionadas y amplificadas con la droga de selección (Lai, Yang, & Kong Ng, 2013).

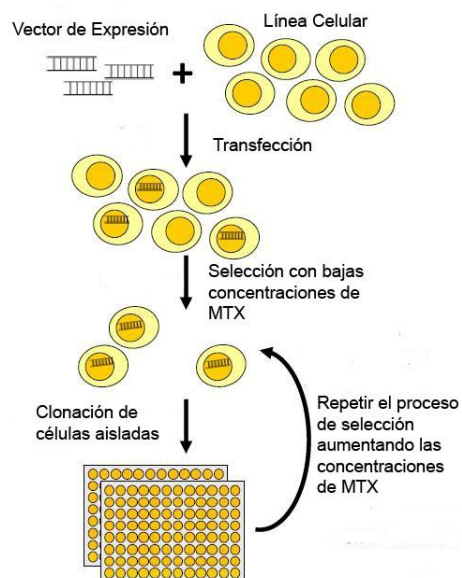


Figura 3.2. Esquema de selección de mutantes utilizando MTX.

3.2.4 Sistema de Bancos Celulares

Una vez obtenido el cultivo de la línea celular productora, se fracciona en varias alícuotas dispuestas en ampollas y criopreservadas en nitrógeno líquido en el que pueden ser preservadas de forma indefinida; estas alícuotas se conocen como “banco celular maestro”. El banco celular maestro no es utilizado para iniciar los cultivos, sino que se utiliza para generar un nuevo banco celular; una ampolla descongelada proveniente del banco celular maestro, se propaga y se vuelve a dividir en alícuotas que son criopreservadas. Esta segunda propagación da origen a lo que se conoce como “banco celular de trabajo”, son estas las ampollas que se utilizan para el cultivo y producción de la proteína de interés, en la que cada vez que se necesite realizar una lote de producción nuevo se descongela una ampolla del banco celular de trabajo y cuando se acabe la última ampolla, se utiliza la segunda ampolla del banco celular maestro para crear un nuevo banco celular de trabajo. De esta forma se asegura la continuidad infinita del cultivo original de trabajo y no es necesario realizar nuevamente los procedimientos de transfección y clonación revisados anteriormente. Se ejemplifica con el siguiente cálculo: si del cultivo de la línea celular productora se obtienen 200 ampollas que constituyen el banco celular maestro y si se requieren utilizar 10 ampollas por año, al no realizar un banco celular de trabajo el cultivo original duraría tan solo 20 años. Sin embargo, si por cada ampolla del banco celular maestro se obtienen 200 nuevas ampollas para constituir el banco celular de trabajo entonces el cultivo original duraría ya no 20 sino 4000 años (Walsh, 2003).

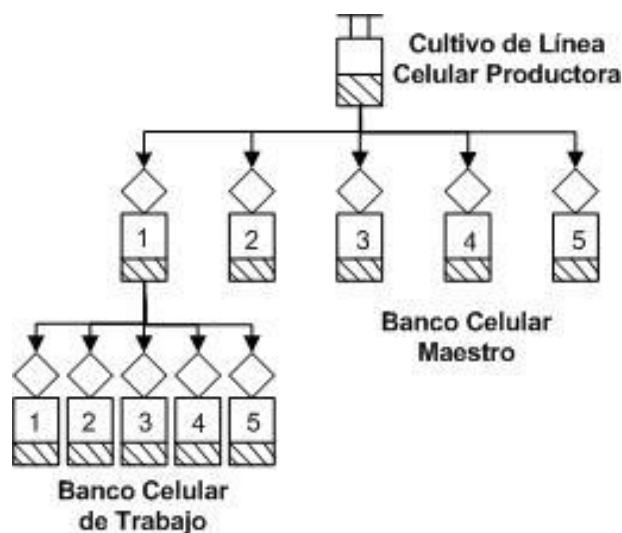


Figura 3.3. Esquema del sistema de Banco Celular.

3.3 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.3.1 Medio de Cultivo

Sustitución de suero animal

Como ya se mencionó en la sección 1.5, el uso de suero animal representa una limitación al momento de validar una proteína con fines terapéuticos, debido a contaminantes y posibles infecciones que podría generar su utilización.

El suero animal puede ser sustituido por diferentes tipos de medios de cultivo que según su contenido pueden ser clasificados en: “Libres de Suero” (SF), es decir que no requiere de suero animal pero puede contener proteínas o fracciones proteicas como tejido animal o extractos vegetales; “Libres de Proteínas” (PF) que no contiene proteínas de alto peso molecular ni fracciones proteicas, pero puede contener fracciones peptídicas como hidrolizados proteicos; “Libre de compuestos derivados de Animales” (AF), haciendo referencia a que no posee componentes de origen animal o humano, pero pueden contener hidrolizados bacterianos, de levadura o extractos vegetales con lo que no son necesariamente medios definidos; y por último se encuentran los medios “Químicamente definidos” (CD) que no contienen proteínas, hidrolizados ni ningún componente cuya composición sea desconocida, pueden añadirse hormonas y factores de crecimiento de origen animal o vegetal altamente purificadas (van der Valk *et al.*, 2010).

Utilizar un medio químicamente definido, implica a su vez conocer de forma acabada los requerimientos nutricionales y el metabolismo de la línea celular utilizada, además de una etapa previa de adaptación de la línea celular para crecer en un medio libre de suero (véase sección 3.2.2), para así identificar cuales sustratos son los indicados para permitir el crecimiento celular y la producción de la proteína.

Con el fin de facilitar los procesos de purificación y la validación del biofármaco producido, se utilizará un medio químicamente definido para la etapa de producción.

Medios formulados químicamente definidos disponibles en el comercio

Actualmente existe una amplia variedad de empresas dedicadas a la formulación de medios de cultivo para el crecimiento de líneas celulares mamíferas (Biowhittaker, Sigma, Gibco, JRH Biosciences, PromoCell, entre otras) que ofrecen productos en diversas presentaciones y que cuentan con las

certificaciones necesarias para validar su uso en la producción de proteínas con fines terapéuticos, razón por la cual se comprará el medio de cultivo preparado.

En cuanto a la presentación del medio de cultivo, se ha decidido adquirir un medio en polvo, ya que facilita su transporte, almacenamiento, es más barato y posee una mayor duración con respecto a la presentación líquida, a pesar de poseer un manejo operacional más complicado y que requiere de una preparación rigurosa.

Con respecto a la fórmula del medio de cultivo a utilizar, se ha seleccionado el medio de cultivo “Iscoe’s Modified Dulbecco’s Medium” (de ahora en adelante IMDM) para la producción de *rhBMP-2* en células CHO, debido a que es un medio en polvo bastante utilizado en la producción de proteínas recombinantes y es de composición conocida, lo cual es importante al momento de realizar los balances de masa, los procesos de purificación de la proteína y facilita la validación del producto para uso terapéutico ante organismos de salud calificados. Las características principales del medio IMDM se presentan en el Anexo B.2.

Consideraciones y mejoras en el medio de cultivo para la producción de *rhBMP-2* en células CHO

Como ya se mencionó anteriormente en el Capítulo 1 de este informe, existen diversos estudios sobre el metabolismo de las células animales que arrojan evidencia sustancial para incorporar modificaciones a los medios de cultivo convencionales con el objetivo de reducir desechos metabólicos y aumentar la viabilidad celular, aunque a veces pueda disminuir la velocidad de crecimiento, como por ejemplo al utilizar substitutos de glucosa y glutamina, como la galactosa y el glutamato respectivamente; sin embargo, para los alcances de este estudio se escapa de los objetivos realizar modificaciones de esta índole por lo que no se considerará la opción de reemplazar fuentes de carbono y de energía.

Una consideración importante es la publicada en la patente perteneciente a Wyeth LLC del año 2011, que considera que la concentración de la vitamina B6 en forma de piridoxal no debe superar el 55% de su concentración total, además de que la concentración de hierro en el medio de cultivo debe ser al menos de 2,25 μM con el fin de mejorar la producción de *rhBMP-2* en cultivos de células CHO (Estados Unidos Patente nº US 8.039.231 B2, 2011).

El medio IMDM cumple con la primera observación ya que la vitamina B6 no se encuentra disponible como piridoxal, sin embargo este medio no posee sales de hierro por lo que la segunda recomendación sobre la concentración de este nutriente no se cumple. Por esta razón, se evaluará posteriormente la

factibilidad de incorporar la concentración de hierro necesaria en el medio de cultivo con el fin de aumentar la producción de la proteína según criterios económicos y legales sobre el pago y derechos de uso de patentes.

Composición del medio de cultivo a utilizar

A continuación se presenta la composición del medio de cultivo IMDM:

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo IMDM.

Componentes	Peso Molecular	Concentración [g/l]	[mM]
Aminoácidos			
Glicina	75	0,03	0,4
L-Alanina	89	0,025	0,280899
L-Arginina (hidrocloruro)	211	0,084	0,398104
L-Asparagina·H ₂ O	150	0,0284	0,189333
L-Ácido aspártico	133	0,03	0,225564
L-Cisteína 2HCl	313	0,09124	0,291502
L-Ácido glutámico	147	0,075	0,510204
L-Glutamina	146	0,584	4
L-Histidina (hidroloruro·H ₂ O)	210	0,042	0,2
L-Isoleucina	131	0,105	0,801527
L-Leucina	131	0,105	0,801527
L-Lisina (hidrocloruro)	183	0,146	0,797814
L-Metionina	149	0,03	0,201342
L-Fenilalanina	165	0,066	0,4
L-Prolina	115	0,04	0,347826
L-Serina	105	0,042	0,4
L-Treonina	119	0,095	0,798319
L-Triptófano	204	0,016	0,078431
L-Tirosina (Sal disódica dihidratada)	261	0,10379	0,397663
L-Valina	117	0,094	0,803419
Vitaminas			
D-Biotina	244	0,000013	5,33E-05
Cloruro de Colina	140	0,004	0,028571
Pantotenato D-Cálcico	477	0,004	0,008386
Ácido Fólico	441	0,004	0,00907
Nicotinamida	122	0,004	0,032787
Hidrocloruro de Piridoxina	206	0,004	0,019417
Riboflavina	376	0,0004	0,001064
Hidrocloruro de Tiamina	337	0,004	0,011869
Vitamina B12	1355	0,000013	9,59E-06
myo-Inositol	180	0,0072	0,04

Tabla 3.1 (Continuación). Composición del medio de cultivo IMDM.

Componentes	Peso Molecular	Concentración (g/L)	mM
Sales Inorgánicas			
Cloruro de Calcio (CaCl ₂) (anhyd.)	111	0,165	1,486486
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄) (anhyd.)	120	0,0977	0,814167
Cloruro de Potasio (KCl)	75	0,33	4,4
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	84	1,5	17,85714
Cloruro de Sodio (NaCl)	58	4,505	77,67241
Fosfato de Sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	138	0,125	0,905797
Selenito de Sodio (Na ₂ SeO ₃) (anhyd.)	173	0,0000173	0,0001
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	101	0,000076	0,000752
Otros Componentes			
D-Glucosa (Dextrosa)	180	4,5	25
Piruvato de Sodio	110	0,11	1
HEPES	238	5,958	25,03361

Con respecto a la adición de hormonas tales como insulina o transferrina, se recomienda realizar pruebas de laboratorio y evaluar el crecimiento de la línea celular sólo con el medio de cultivo descrito, ya que de obtener buenos resultados es conveniente no agregar compuestos derivados de animales o sustancias que indefinan la composición del medio. En caso de ser estrictamente necesario deberán incorporarse.

3.3.2 Condiciones de Operación

Esterilidad

Como en todo cultivo, las condiciones de esterilidad son de suma importancia para evitar contaminación con microorganismos, que competirían con las células por el consumo de nutrientes, generarían condiciones de estrés que podría desencadenar señales apoptóticas, o incluso podrían infectar en algunos casos a la línea celular pudiendo causar mutaciones en la misma, causando que el producto final se viera afectado en calidad y en algunos casos incluso la seguridad de su uso para fines terapéuticos. Es por esto que para fines de validación del producto por organismos de salud especializados, es necesario llevar todo el cultivo bajo condiciones de estricta esterilidad.

Por otro lado el medio de cultivo posee compuestos termolábiles como vitaminas, por lo que no puede utilizarse un proceso de esterilización por temperatura; en su defecto se utilizan microfiltros para asegurar la retención de los microorganismos.

Es observado en bibliografía que los filtros utilizados para esterilizar medios y otras soluciones tienen un tamaño de poro de 0,22 μm los cuales son capaces de retener todos los microorganismos presentes (utilizando como parámetro a *Pseudomonas diminuta* una de las bacterias conocidas más pequeñas con un diámetro de 0,3 μm). Posterior a la etapa de esterilización, toda la producción debe ser realizada en condiciones de asepsia estricta.

Todo material o equipo que sea utilizado debe ser esterilizado previamente en autoclave o con vapor de caldera.

Temperatura

La temperatura óptima de operación depende de la temperatura del cuerpo del animal del que proviene la línea celular y de las variaciones en temperatura según la anatomía (temperaturas distintas en distintos tejidos) (Freshney, 2000). La mayoría de las células mamíferas crecen de forma óptima entre los 35 y 37°C (Léo, Lima, Torres, & Moraes, 2008), aunque se han realizado estudios que revelan un aumento en la productividad específica y disminución en la velocidad específica de crecimiento si las células son cultivadas en condiciones de hipotermia suave cercano a 31°C (Vergara, Becerra, Díaz-Barrera, Berrios, & Altamirano, 2012).

Los efectos de la hipotermia suave como técnica de manipulación ambiental sobre la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células CHO es específico para cada proteína, revelando la necesidad de realizar estudios sobre esta condición para la producción de *rhBMP-2*, sin embargo se aprecia una tendencia clara de aumento en la productividad entre 1.5 y 6 veces al trabajar entre 30 y 34°C comparado con las condiciones estándar de producción (Becerra, Berrios, Osses, & Altamirano, 2012).

Por otro lado, se sabe que la proteína *rhBMP-2* no debiera estar expuesta a temperaturas que superen los 30°C por períodos prolongados de tiempo (Medtronic, 2012), con el fin de no desestabilizar su estructura e impedir que disminuya su actividad biológica; considerando los alcances de este trabajo se sugiere utilizar una temperatura para la fase de crecimiento de 37°C y para la fase de producción de 31°C, recalando la necesidad de realizar ensayos para determinar la real productividad para *rhBMP-2* bajo condiciones de hipotermia suave.

pH

El control de pH es fundamental para el cultivo de células mamíferas. Muchas líneas celulares crecen bien a pH 7,4 aunque el pH óptimo de crecimiento varía en cada línea celular; si bien esta variación no suele ser muy grande, se sabe que los fibroblastos por ejemplo, crecen mejor a pH 7,4 – 7,7 y células transformadas pueden crecer mejor a pH 7,0 – 7,4 (Freshney, 2000) (Léo *et al.*, 2008).

Es por esto que en cultivos de células CHO se utiliza un rango de pH entre 6,8 y 7,4, correspondientes a valores fisiológicos (Castilho, 2012).

Para mantener estas condiciones se utiliza un sistema de tampón CO₂-bicarbonato, con el fin de compensar la formación de CO₂ metabólico y ácido láctico proveniente del metabolismo de la glucosa.

Las concentraciones de NaHCO₃ y el porcentaje de saturación de CO₂, se encuentran establecidos según el medio de cultivo a utilizar, correspondientes a 1,5 [g/L] de bicarbonato de sodio y a un 5% de saturación de dióxido de carbono en la fase gaseosa para el medio de cultivo IMDM.

Osmolaridad

La mayoría de las células poseen una amplia tolerancia a la presión osmótica, sin embargo las células mamíferas al no poseer pared celular se vuelven sensibles a cambios drásticos en la osmolaridad del medio. En la práctica, la mayoría de las células mamíferas se cultivan considerando una osmolaridad óptima entre los 260 y 320 mOsm/kg (Léo *et al.*, 2008), sin embargo una vez seleccionada la osmolaridad de operación, esta debe permanecer constante a ± 10 mOsm/kg (Freshney, 2000).

Oxígeno disuelto

En lo que se refiere a la demanda de oxígeno de un cultivo, el valor es muy variable dependiendo de la línea celular que se utilice, en general para células mamíferas se prefiere utilizar condiciones de presión parcial de oxígeno ligeramente por debajo de la atmosférica, manteniéndola entre 30 y 60% de saturación de aire (Léo *et al.*, 2008).

La aireación puede suministrarse por difusión por membranas, o bien, por sistemas de microdifusores; las burbujas generadas por microdifusores son de mayor tamaño que las generadas por los sistemas de membranas y las burbujas de mayor tamaño podrían generar situaciones de estrés celular (Kretzmer, 2002). Sin embargo, dado que la difusión por membrana genera problemas de transferencia

de oxígeno es preferible utilizar un sistema de microdifusores para proporcionar la aireación del sistema.

Requerimientos de Agitación

La agitación busca lograr una homogeneidad en las condiciones del reactor, afectando la transferencia de masa y de calor en el sistema. La homogeneidad de nutrientes y condiciones de operación en el tanque es de suma importancia para asegurar un correcto crecimiento de la línea celular y minimizar posibles variaciones que pudieran desencadenar señales de estrés en las células mamíferas, por lo que es indispensable evitar zonas de estancamiento en las que se produzcan diferencias entre las condiciones establecidas.

Por otro lado las células mamíferas, como ya ha sido expuesto anteriormente, son altamente sensibles a los esfuerzos de corte, por lo que la velocidad de agitación no debe ser muy alta para evitar la pérdida de la viabilidad celular.

Es por estas razones que la velocidad de agitación debe permanecer en cierto rango, que no debe ser muy bajo para asegurar la homogeneidad producto del mezclado, ni muy alto para evitar el daño celular; un rango óptimo de velocidad de agitación para cultivos de células mamíferas varía entre 40 y 90 rpm (Papoutsakis, 1991).

Es recomendable agregar agentes protectores contra el cizallamiento para cuidar que los esfuerzos de corte producidos por el rotor y las aspas del agitador no dañen las células dentro del reactor, sin embargo cuando se trata de cultivos libres de suero animal, se vuelve una necesidad incorporar estos agentes con el fin de aumentar la viscosidad del medio. Uno de los agentes protectores más utilizados y que será considerado en el proceso de producción de *rhBMP-2*, es el tensoactivo Pluronic F-68®.

Otro tipo de agitación se realiza por medio de un movimiento oscilatorio en forma de ola, que a través de un suave movimiento y ajustando los grados de inclinación, se logra una adecuada transferencia de oxígeno. Este tipo de agitación se abarca con más detalle en el Capítulo 5 de este proyecto, junto a la selección del reactor.

Tipo de reactor y modalidad de cultivo

Para la etapa de producción se utilizará un reactor “Single-Use”, donde la agitación será provista por un movimiento oscilatorio. El volumen útil del reactor es de 25 [l] y su determinación se explica en el Capítulo 4.

En cuanto a la modalidad de cultivo, se ha decidido dividir la producción en dos etapas. En primer lugar será llevado a cabo un cultivo por lote, el cual es cargado con el inóculo proveniente de la propagación del Banco Celular de Trabajo y con medio de cultivo, para alcanzar una alta densidad celular ($1 \cdot 10^6$ células/ml) y lograr la adaptación de la línea celular al reactor, posteriormente se dará paso al cultivo continuo en perfusión para continuar con la fase de producción.

Al cambiar de modalidad, se debe esperar el tiempo necesario para permitir la estabilización del cultivo a la nueva modalidad, por lo que se considera un cultivo en perfusión transiente hasta llegar a una densidad celular de $1 \cdot 10^7$ células/ml que se mantenga constante (estado estacionario).

Como ya se mencionó anteriormente, para beneficiar la producción de *rhBMP-2*, se cambiarán las condiciones de cultivo, bajando la temperatura a 31°C con el fin de generar un ambiente de hipotermia suave, esperando que la productividad específica aumente al menos en 2 veces.

No se disponen de datos en bibliografía sobre productividad específica de *rhBMP-2* para cultivos en suspensión con modalidad de perfusión ni a la condición de hipotermia suave a la que será sometido el cultivo, sin embargo se determinó que en un cultivo en monocapa realizado en matraces a 37°C la productividad específica de la proteína corresponde a 16 ng/ 10^6 células/día (Zhou, 2008). En la práctica, con los avances que existen hoy en día y con las condiciones de cultivo en la etapa de producción se debiera obtener una productividad específica similar o superior a la reportada, por lo que para efectos de cálculos se utilizará este dato como referencia.

Respecto a la modalidad en que se operará la etapa de producción, cabe destacar que la tasa de dilución del cultivo continuo será de 2,5 [d⁻¹], de modo que dado un volumen de reactor de 25 [L], el volumen diario a tratar será de 62,5 [L] de medio perfundido. Por lo tanto, una vez establecida la condición de hipotermia suave y alcanzado el estado estacionario en cultivo continuo, el medio que perfunde desde el reactor será recolectado en un estanque desechable durante un día, es decir la etapa de recuperación y purificación será diseñada para tratar un volumen total de al menos 62,5 [L]. Cabe señalar que dada

la productividad de las células CHO para *rhBMP-2* y las condiciones establecidas, se espera obtener un aproximado de 8,5 [mg de *rhBMP-2*/d].

En cuanto a los sistemas de retención celular para llevar a cabo el cultivo en perfusión, se distinguen dos principios de separación: por tamaño y por densidad.

Hay diversos estudios en los que se utilizan algunos de estos sistemas, sin embargo en bibliografía se hace referencia repetidas veces a una publicación en particular correspondientes a un estudio comparativo realizado por Voisard y otros, publicado en el año 2003 en la revista *Biotechnology and Bioengineering*, por lo que la selección del sistema de retención a utilizar fue basada en este estudio.

Dispositivos de retención celular por tamaño

- **Filtros Cross-Flow:** El principio de estos filtros se basa en forzar a la suspensión de células a fluir tangencialmente a la membrana. Fueron desarrollados para disminuir la obturación de la membrana debida a la deposición de las partículas en los poros y a la concentración de gradientes de macromoléculas que forman geles y agregados.
- **Módulos de Fibra Hueca:** Producto de la aplicación de una alta velocidad de flujo en la superficie de la membrana, los módulos de fibra hueca también minimizan la obturación. Puede operar con una bomba de diafragma como módulo de filtración externo al biorreactor, en donde se conecta, permitiendo que la suspensión de células sea bombeada al módulo de filtración y luego retorne al reactor en períodos de aproximadamente 10 segundos. Sin embargo se han reportado problemas de estabilidad de la proteína de interés, además de que productos de alto peso molecular han quedado retenidos en las fibras en algunas ocasiones.
- **Filtración con Esfuerzo de Corte Controlado:** Consiste en una cámara externa que contiene un rotor cónico que funciona sobre una membrana plana; el ángulo del cono, la distancia entre el rotor y la membrana, y la velocidad de giro determinan el esfuerzo de corte que se produce sobre la membrana.
- **Filtros Vortex-Flow:** Es un módulo autoclavable formado por tres cilindros concéntricos. Funciona bajo el mismo principio que el de esfuerzo de corte controlado; la suspensión de células fluye entre el espacio interior y el cilindro intermedio en una cámara anular con una abertura de 2 mm, el cilindro intermedio soporta la membrana filtrante mientras rota en el espacio interior. Debido a la rotación se forman vórtices que evitan o previenen la polarización de la concentración y la incrustación de partículas en la superficie de la membrana.

- **Spin-Filter (Filtros de tipo Canasto):** Se puede utilizar una amplia variedad de membranas con distintos tamaños de poro. Las células son retenidas producto de efectos estéricos de rotación de la membrana, permitiendo el uso de tamaños mayores al tamaño promedio de las células. Se pueden emplear como sistemas de filtración internos o externos, y a diferencia de los filtros vortex-flow, los spin-filter poseen la membrana ubicada en el cilindro rotatorio que está fijado a un eje hueco.

Los sistemas de retención celular en un proceso industrial para un cultivo en perfusión debe contar con ciertas características, tales como costos de inversión y operación razonables, estar disponibles en el mercado, combinar una alta capacidad de perfusión con una alta eficiencia de retención, operar durante un ciclo productivo completo sin mantención y ser robustos para minimizar el riesgo de falla, además de ser fáciles de limpiar y esterilizar. Otro punto importante a considerar es que debe operar dentro del rango de perfusión en el que se quiere trabajar (Voisard, Meuwly, Ruffieux, Baer, & Kadouri, 2003).

Al tratarse de una proteína de uso farmacéutico y al poseer una productividad específica tan baja, y considerando que se trabajará con un cultivo de células mamíferas que no alcanzan densidades celulares tan altas como cultivo bacterianos, los volúmenes a utilizar son bastante pequeños. De modo que el rango de perfusión se encontraría entre 0 y 50 l/día según la clasificación de Voisard y otros.

En el rango de perfusión de 0 a 50 l/día, se usan principalmente técnicas basadas en filtración debido a su simplicidad y características; es por esta razón que no se mencionan los sistemas de retención por densidad ya que no serán considerados para el proceso de producción.

De forma más específica, los filtros usados en el rango de perfusión determinado corresponden a spin-filter, filtros vortex-flow y módulos de fibra hueca, ya que son sistemas que poseen potencial de escalamiento.

A continuación se muestran en la Tabla 3.2 las características de los filtros vortex-flow y spin-filter en cultivos de células CHO, y posteriormente en la Tabla 3.3 se presenta una evaluación comparativa de las técnicas de retención.

Es en base a estas características que se consideran dos posibles sistemas de retención para utilizar en el proceso de producción de *rhBMP-2*, correspondientes a un sistema de spin-filter o bien un sistema de filtros vortex-flow.

Tabla 3.2: Características de Filtros Vórtex-Flow y Spin-filter. (Voisard et al., 2003).

Principio	Volumen de Trabajo [L]	Tamaño de Poro [μm]	Área/Volumen [cm^2/L]	Duración del Cultivo [d]	Densidad Celular Viable [10^6Cs/mL]	Viabilidad Celular [%]	Tasa de Perfusión [L/d]
Vórtex-flow	3 - 50	10	66 - 4	30 - 60	10 - 15	95	6 - 100
Spin-filter	10	120	60	30 - 54	70	90	40
Spin-filter	100	20	26,7	14	5	85	100

Tabla 3.3: Comparación de dispositivos de retención celular. (Voisard et al., 2003).

Técnica de Retención	Alta Capacidad	Alta Retención	Operación de Largo Plazo	Robustez del Sistema	Manejo Suave de Células	Perfundido Clarificado	Baja Inversión	Bajo Costo de Operación
Filtración Vórtex-Flow	-	$\pm$	+	+	$\pm$	-	-	+
Fibras Huecas	$\pm$	++	+	+	$\pm$	++	+	-
Spin-filter	+	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	-	-	+

Hoy en día la tecnología de filtros vortex-flow no es fácil de encontrar en el mercado, poco a poco los productores de este tipo de filtros fueron descontinuándolo. Una de ellas es la marca Membrex, que en la década del 90 fue una de las grandes distribuidoras de este tipo de tecnología (siendo referenciada en muchas publicaciones relacionadas a sistemas de filtración para perfusión), sin embargo la empresa desapareció, y no fue posible encontrar algún distribuidor de esta tecnología durante la revisión de mercado que fue realizada, concluyendo finalmente que para realizar una filtración en perfusión lo más utilizado actualmente son los spin-filters.

Finalmente el tipo de filtro que se utilizará no corresponde a ninguno de los revisados, ya que el reactor seleccionado posee una membrana integrada que permite operar en perfusión. Esta decisión será tratada con más detalle en el Capítulo 5 de este proyecto, donde se profundizará sobre esta tecnología.

3.4 RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN

En vista de que no existe un método de retención celular perfecto para los cultivos en perfusión, se considerará que la solución a tratar contiene medio de cultivo agotado, células, restos celulares y productos metabólicos tales como amonio, lactato y la proteína de interés; por lo tanto es necesario iniciar con una etapa de recuperación en la que se eliminen la biomasa y los restos celulares.

Para separar las células de la solución existen cuatro alternativas: sedimentación, precipitación, microfiltración y centrifugación.

Respecto a la sedimentación, las células se demoran en decantar por lo que utilizarla como estrategia de separación resultaría ineficiente; y la precipitación por otro lado, consta de operaciones de coagulación o floculación, las cuales se descartan debido a que requieren del uso de sales de iones polivalentes, como el hierro, aluminio y calcio y polielectrolitos, que podrían generar problemas de toxicidad (Aroca & Zúñiga, 2002).

La microfiltración y la centrifugación, en cambio, son alternativas válidas para la separación de células en el medio. Sin embargo, considerando que los volúmenes a tratar son pequeños y que la remoción de células se lleva a cabo prácticamente completa en el reactor con el sistema de perfusión, no es errado pensar en realizar un pre-tratamiento del cultivo recuperado pasando directamente a una etapa de concentración.

Normalmente el hecho de no realizar un proceso de separación de biomasa, podría ocasionar un ensuciamiento más rápido de lo habitual en algunos equipos, pero como ya se mencionó la cantidad de células presentes que no hayan sido retenidas en el fermentador debiera ser muy baja, y probablemente gran parte seguiría como fragmentos de una célula lisada por lo que no ocasionaría problemas operacionales en caso de no contar con la etapa de microfiltración.

3.4.1 Concentración del Producto

Luego de separar la biomasa, es necesario concentrar el producto para facilitar las etapas de purificación en el proceso.

Dentro de las operaciones alternativas para la concentración del producto se mencionan la ultrafiltración, extracción, osmosis inversa, evaporación, precipitación y destilación; sin embargo la única operación que no implica la adición de soluciones que pudieran contaminar el producto o la aplicación de temperatura y que permite realizar una concentración adecuada es la ultrafiltración.

La ultrafiltración es una operación ampliamente usada para la concentración de proteínas, que consiste en un sistema de filtración por membranas. La presión de operación típica varía entre 0,2 y 0,5 MPa y el flujo promedio varía entre 20 y 50 l/(m²h) (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 1995).

Considerando el tamaño de la proteína de interés, se pretende utilizar un sistema de ultrafiltración con una membrana de 30 kDa.

Membranas

Las membranas constituyen una red de polímeros compactados por sinterización, y los principales materiales de las que están hechas son celulosa regenerada y polietersulfona. En general para la concentración de proteínas, se prefiere el uso de membranas de celulosa debido a que presentan una baja obturación y baja adsorción de proteínas, permitiendo el paso de un flujo elevado y una alta capacidad de retención (Barros, Hurtado, Altamirano, & Illanes, 2005).

3.4.2 Separación por Cromatografía

A continuación se señala una breve descripción de las distintas técnicas utilizadas para la purificación de *rhBMP-2* producidas en células CHO.

Cromatografía de intercambio iónico

Esta separación se basa en la diferencia de la carga molecular de las biomoléculas. Puesto que la carga molecular depende del pH y la fuerza iónica, cualquier anión o catión en un soporte puede ser usado para realizar la separación. En la práctica sin embargo, la selección normalmente está determinada por el pH al cual es estable el producto que se desea purificar (Tejeda *et al.*, 1995).

En el caso de la *rhBMP-2*, se ha reportado el uso de cromatografías de intercambio iónico con soportes de Q-Sepharose que corresponden a grupos de intercambio aniónico fuerte, sin embargo el proceso de purificación global tuvo un rendimiento de tan sólo 29% (Rui-Shu, Shi-Quan, Xiang-Yang, & Jian-Ning, 2010).

Cromatografía de afinidad

Se basa en interacciones específicas entre biomoléculas. Es una operación apropiada cuando se trabaja con grandes volúmenes en los que la proteína está en bajas concentraciones. Se puede utilizar fenilboronato o lectinas unidas a N-acetilglucosamina para capturar proteínas glicosiladas (Barros *et al.*, 2005).

Se ha reportado el uso de una cromatografía de afinidad con heparina para purificar *rhBMP-2* producida en células CHO, gracias a la carga positiva de la proteína, esta es retenida por la columna negativa de heparina, por lo que podría ser una alternativa a considerar aunque de bajo rendimiento (cerca a un 60%) (Rui-Shu *et al.*, 2010).

Cromatografía de filtración en gel

Este tipo de cromatografías separa moléculas en base a su tamaño molecular; tiene dos aplicaciones principales: remoción de pequeñas moléculas de las proteínas y remoción de proteínas contaminantes de la proteína producto (Tejeda *et al.*, 1995).

Las cromatografías de filtración en gel utilizadas en la purificación de *rhBMP-2*, generalmente son de la serie Sephacryl S, en las que se han demostrado buenos resultados (Estados Unidos Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013) (Rui-Shu *et al.*, 2010), obteniendo un alto rendimiento y grado de pureza al finalizar la operación. Usualmente se utiliza como operación final del proceso de purificación.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

Una cromatografía de interacción hidrofóbica separa proteínas de acuerdo a diferencias en hidrofobicidad de su superficie, utilizando una interacción reversible entre estas proteína y la superficie hidrofóbica que actúe como medio en la cromatografía (GE Healthcare, 2006).

Se ha reportado el uso de una cromatografía de interacción hidrofóbica “butyl sepharose 4 fast flow” para purificar *rhBMP-2* con un alto rendimiento y demostrando una alta resolución (ver Tabla 3.4) (Estados Unidos Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

3.4.3 Esquema del Proceso de Purificación

Producto de la poca información respecto a procesos de purificación de *rhBMP-2* producida en células CHO disponible en fuentes bibliográficas, y en este proyecto no se ha considerado realizar pruebas de laboratorio para obtener datos acerca de la aplicación de distintas técnicas sobre la purificación de la proteína, se optó por utilizar el proceso descrito en la patente número US 2013/0060012 A1 publicada por Young-Bock Shim el año 2013, asumiendo los costos que pudiera significar usar esta patente, que considerando el valor del producto no debiera implicar un problema, gracias a los altos rendimientos y grado de pureza que posee el producto final, expuestos en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Rendimiento y pureza de *rhBMP-2* recuperada de cada etapa de purificación. (Estados Unidos Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Pasos de Purificación	Rendimiento (%) de <i>rhBMP-2</i>	Pureza (%) de <i>rhBMP-2</i>
Cultivo Celular	100	5,7
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	95	85
Diafiltración	95	85
Cromatografía de Exclusión Molecular	88	95
<i>rhBMP-2</i> Purificada	88	95

A continuación se esquematiza en la Figura 3.4 el proceso de purificación propuesto por Young-Bock Shim:

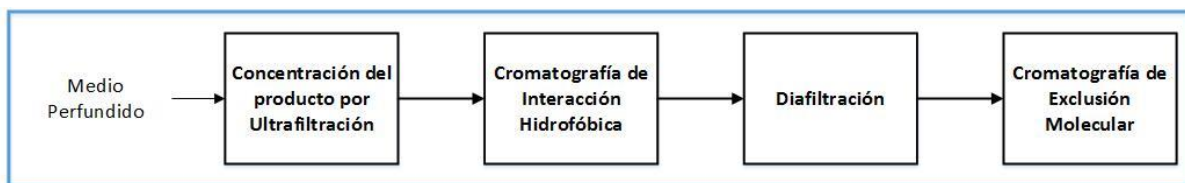


Figura 3.4. Esquema de las etapas de recuperación y purificación de rhBMP-2.

3.4.4 Filtración Inicial

Se llevará a cabo una ultrafiltración con membranas de celulosa regenerada de 30 kDa y un filtro de 0,1-1 μm . A continuación se presentan en la Tabla 3.5 las características de la membrana seleccionada.

Tabla 3.5: Características de la membrana de ultrafiltración seleccionada.

Parámetro	Valor
NMWLCO	30 kDa
Material de la membrana	Celulosa regenerada
Material de soporte	UHMW Polietileno
Retención de Dextrano	90% a 30kDa
Espesor promedio	130 micrones
Permeabilidad del aire	0 a 30 psi
Flujo de agua promedio	21,5 l/mh/psi
Rango de pH	2 - 13
Temperatura máxima de operación	80 °C
Ancho máximo	13 pulgadas
Longitud estándar	350 pie

3.4.5 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Siguiendo el esquema de purificación, se realizará una cromatografía de interacción hidrofóbica “Butyl Sepharose 4 Fast Flow”, que será comprada a la empresa GE Healthcare. En la Tabla 3.6 se muestran las características de la cromatografía seleccionada.

Tabla 3.6: Características del medio Butyl-Sepharose 4 Fast Flow.

Parámetro	Valor
Grado de sustitución	aprox. 50 μmol butyl/ml gel
Tamaño de Partícula	90 μm
Rango de tamaños del medio	45 - 165 μm
Estructura del Medio	4% agarosa
Velocidad de Flujo Lineal a 25°C	> 150 cm/h a 100 kPa
Estabilidad de pH	3 - 13
Estabilidad Química por 7 días a 40°C	1M NaOH, 1mM HCl, 70% etanol, 30% isopropanol, 6M guanidina hidrocloreuro
Estabilidad térmica	3 - 40°C
Autoclavable	121°C por 20 minutos en agua

3.4.6 Diafiltración

Corresponde a una operación cuyo objetivo es la remoción de sustancias consideradas contaminantes y que poseen un tamaño que les permitirá atravesar la membrana de ultrafiltración. Se emplea una entrada de solvente puro a la corriente de concentrado para reemplazar el flujo de salida del permeado (Aroca & Zúñiga, 2002).

Antes del siguiente paso cromatográfico, es necesario realizar una diafiltración con una membrana de 30 kDa.

Sin embargo en este diseño, se utilizará la diafiltración no para purificar la proteína sino más bien para realizar un recambio de soluciones tampón, para así acondicionar el medio para aumentar los rendimientos de la cromatografía de exclusión molecular.

3.4.7 Cromatografía de Exclusión Molecular

Como paso final en el proceso de purificación, se realizará una cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel con soporte de Sephacryl S-100. A continuación en la Tabla 3.7 se muestran las características de la cromatografía seleccionada.

Tabla 3.7: Características del medio Sephacryl S-100

Parámetro	Valor
Rango de uso fraccional	1000 - 100000 g/mol
Rango de tamaños del medio	25 - 75 μ m
Estructura del Medio	Alil dextrano y N,N'-metilen bisacrilamida
Estabilidad de pH	3 - 11
Estabilidad Química por 7 días a 40°C	Estable a todos los buffers de uso común, 0,2M NaOH, 0,1M HCl, 24% etanol, 30% propanol, 30% acetonitrilo, 8M urea, 1% SDS, 2M NaCl, 6M guanidina hidrocloreuro
Estabilidad térmica	3 - 40°C
Tamaños de empaque	150 ml, 750 ml y 10 l

3.5 FORMULACIÓN FINAL

3.5.1 Adición de Excipientes

La composición de excipientes se formula en base a la adición de varias sustancias que estabilizan el producto biofarmacéutico una vez purificado, con el objetivo de proteger su actividad y prolongar su duración (Walsh, 2003).

En el documento “INFUSE® Bone Graft: Important Medical Information”, publicado por Medtronic® y disponible en su página web, se detalla la composición del producto INFUSE® Bone Graft.

En función de lograr un producto de calidad y formulación similar, se utilizará la misma formulación de excipientes detallada a continuación:

- Cada mililitro de solución de *rhBMP-2* reconstituida contiene: 1.5 mg de *rhBMP-2*; 5.0 mg de sucrosa; 25.0 mg de glicina; 3.7 mg de ácido L-glutámico; 0.1 mg de cloruro de sodio; 0.1 mg de polisorbato 80; 1.0 mL de agua estéril (Medtronic, 2012).

3.5.2 Esterilización

La esterilización del producto formulado se realiza mediante filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro antes de la etapa de distribución, según lo explicado en la sección 3.3.2.

3.5.3 Distribución y Envasado

El producto terapéutico una vez esterilizado será envasado en ampollas de vidrio en condiciones estériles y llevadas a una cámara de liofilización para su disposición final.

El proceso de llenado normalmente emplea un sistema de llenado de líquido altamente automatizado, y todos los equipos, cañerías y demás partes del proceso que entren en contacto con el producto esterilizado, deben ser obviamente esterilizadas previamente por algún método (Walsh, 2003).

3.5.4 Liofilización

La liofilización o secado por congelación corresponde a la congelación del producto líquido en una cámara de vacío que por efectos de baja presión, permite la sublimación del agua congelada a temperaturas muy bajas, asegurando la integridad de la estructura proteica ya que el producto no es sometido a altas temperaturas en ningún momento.

El resultado de este proceso es un producto en polvo listo para ser etiquetado y almacenado para su posterior distribución y venta; es decir, luego de la liofilización del producto se obtiene la proteína recombinante lista para ser utilizada.

3.5.5 Etiquetado y Almacenamiento

El producto final debe ser rotulado según la normativa vigente del país en el que será comercializado y almacenado a temperatura ambiente entre los 15 y 30°C para asegurar la calidad e integridad de la actividad biológica de la proteína recombinante.

La normativa vigente para el envasado y etiquetado de productos farmacéuticos en Chile se encuentra disponible en los artículos 48 al 64 del Decreto N°1876/95 Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos.

3.6 CONTROL DEL PROCESO

Por tratarse de la elaboración de un producto farmacéutico, es necesario ser estrictos con el control de calidad y de seguridad en el proceso con el fin de evitar contaminación, daño estructural en la proteína o pérdidas en la viabilidad celular, con el fin de no perder productividad, actividad biológica y evitar la

incorporación de riesgos que pudieran significar enfermedades o cuadros severos, o incluso la muerte, del consumidor final del producto.

A continuación se revisan los principales parámetros que deben ser controlados en cada etapa del proceso y finalmente se presentan algunas pruebas que deben ser realizadas para determinar cada parámetro.

3.6.1 Propagación

En esta etapa es necesario cuidar que el crioval del banco celular de trabajo no haya perdido viabilidad celular, conserve el plásmido transfectado y que, al igual que el medio de cultivo a utilizar, se encuentre libre de contaminantes biológicos con el objetivo de asegurar una producción exitosa.

3.6.2 Producción

En la etapa de producción es necesario cargar el reactor en condiciones de esterilidad, así como también se deben controlar las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo. Temperatura, pH, osmolalidad y concentración de oxígeno disuelto deben ser monitoreados por controladores automáticos en línea.

La concentración de metabolitos tóxicos, sobre todo en la primera etapa del cultivo por lotes, deben ser medidos cada una hora y luego en el cultivo en perfusión al menos una vez por turno de trabajo durante la fase de producción. Es necesario revisar principalmente los niveles de amonio y lactato.

De la misma forma es necesario revisar los principales nutrientes que constituyen la fuente de carbono y energía de la línea celular, haciendo referencia a la concentración de glucosa y glutamina.

La viabilidad celular también debe ser controlada para detectar condiciones de estrés que pudieran haber desencadenado señales de apoptosis en el cultivo, debido a condiciones ambientales, con el fin de remediar la situación antes de que se vuelva irreversible.

Por último es necesario controlar la cantidad de proteína en el medio de cultivo, la concentración de proteínas totales y más importante aún, la concentración de la proteína de interés para verificar que se esté excretando al medio de cultivo. Este control es necesario que se realice al menos una vez al día durante la fase de producción.

3.6.3 Recuperación y Purificación

Antes de iniciar la etapa de recuperación y purificación de la *rhBMP-2*, es necesario saber exactamente cuál es la concentración de proteínas totales y de la proteína de interés. Durante cada una de las etapas de purificación es necesario controlar la concentración de proteínas totales, la concentración de *rhBMP-2*, y la presencia de contaminantes biológicos.

Finalmente, luego de la última etapa de purificación es necesario controlar la presencia de contaminantes de bacterias, virus, sustancias pirogénicas, DNA, proteínas contaminantes y micoplasmas, así como también se debe testear la actividad biológica de la proteína, y su estabilidad.

3.6.4 Formulación Final del Producto

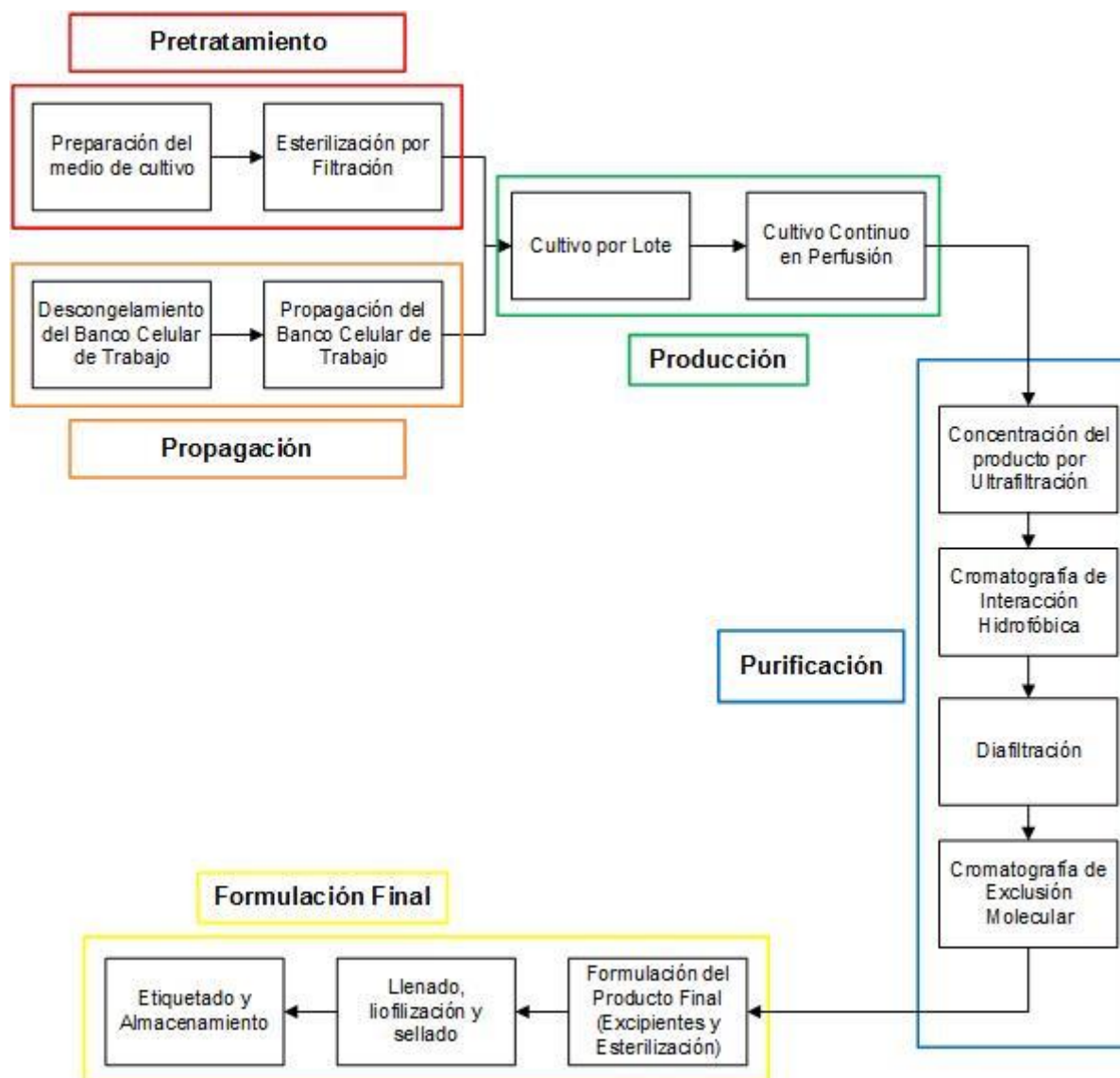
Una vez terminado el producto final, se recomienda hacer un muestreo aleatorio simple en la línea final de envasado para hacer pruebas in vivo con el fin de determinar el efecto producido en animales.

3.6.5 Resumen de Parámetros de Control y Técnicas de Análisis

A continuación se presentan las técnicas empleadas para la medición de los distintos parámetros mencionados a lo largo de este capítulo (ver Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Resumen de técnicas de control para cada parámetro.

Parámetro a Controlar	Prueba
Viabilidad Celular	Tinción con azul de Tripán
Conservación del Plásmido	Cultivo con presencia de MTX (marcador de selección)
Contaminación por micoplasmas	Micoplasma test kit (mdbiosciences)
Concentración de Compuestos Tóxicos	Uso de kits comerciales (sigma)
Concentración de Nutrientes (glucosa y glutamina)	Uso de kits comerciales (sigma)
Proteínas Totales	Espectrofotometría UV-visible
Proteínas de Interés	Electroforesis capilar / ELISA
Contaminación endotoxinas y pirógenos	Test en conejos
Potencia/Actividad	Bioensayo (ratones) e Inmunoensayo (ELISA)
Estabilidad	Isoelectroenfoque
Pureza	HPLC, SDS-PAGE

3.7 ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE *rhBMP-2* EN CÉLULAS CHOFigura 3.5. Esquema del proceso de producción de *rhBMP-2* en células CHO.

3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 3

- Aroca, G., & Zúñiga, M. E. (2002). Bioseparaciones. En F. Acevedo, J. C. Gentina, & A. Illanes, *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (págs. 293-347). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Barros, I., Hurtado, I., Altamirano, C., & Illanes, A. (2005). *Estudio de Factibilidad Técnico-Económica para la instalación de una planta productora de Eritropoyetina recombinante*. Tesis, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso.
- Becerra, S., Berrios, J., Osses, N., & Altamirano, C. (2012). Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochemical Engineering Journal*(60), 1-8.
- Bollati-Fogolín, M., & Comini, M. A. (2008). Clonagem e Expressão de Proteínas Heterólogas em Células Animais. En Â. M. Moraes, E. F. Pires Augusto, & L. R. Castilho, *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica* (págs. 42-80). São Paulo, Brasil: Editora Roca Ltda.
- Castilho, L. (29 de Octubre - 9 de Noviembre de 2012). Apuntes del Curso de Postgrado "Tecnología de Cultivo de Células Animales". *Aspectos Básicos del Cultivo de Células Animales (Basic Aspects of Animal Cell Cultivation)*. Santa Fe, Provincia de Santa Fe, Argentina: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad del Litoral.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York, United States: Wiley-Liss.
- GE Healthcare. (2006). Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography.
- Kretzmer, G. (2002). Industrial Processes with Animal Cells. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 135-142.
- Lai, T., Yang, Y., & Kong Ng, S. (2013). Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals*(6), 579-603.
- Léo, P., Lima, A. L., Torres, C. A., & Moraes, Â. M. (2008). Células Animais: Conceitos Básicos. En Â. M. Moraes, E. F. Pires Augusto, & L. R. Castilho, *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica* (págs. 15-41). São Paulo, Brasil: Editora Roca Ltda.
- Luan, Y.-T., Wang, W., Nyberg, G., Gomes, J. M., Drapeau, D., & Cardoza, T. (2011). *Estados Unidos Patente nº US 8.039.231 B2*.
- Medtronic. (2 de Enero de 2012). *INFUSE Bone Graft: Important Medical Information*. Recuperado el 26 de Junio de 2013, de Bone graft for certain spinal surgery, fracture treatment and oral surgery: https://www.infusebonegraft.com/trauma_package_insert.pdf

- Moraes, Â. M. (29 de Octubre - 9 de Noviembre de 2012). Apuntes del Curso de Postgrado "Tecnología de Cultivo de Células Animales". *Fomulação de Meios de Cultivo para Células Animais*. Santa Fe, Provincia de Santa Fe, Argentina: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad del Litoral.
- Papoutsakis, E. (1991). Media Additives for Protecting Freely Suspended Animal Cells Against Agitation and Aeration Damage. *Trends in Biotechnology*, 9, 316-324.
- Prieto, C. (29 de Octubre - 9 de Noviembre de 2012). Apuntes del Curso de Postgrado "Tecnología de Cultivo de Células Animales". *Generación de Líneas Celulares Recombinantes, Transgénesis Mediada por Vectores Lentivirales*. Santa Fe, Provincia de Santa Fe, Argentina: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.
- Rui-Shu, L., Shi-Quan, W., Xiang-Yang, T., & Jian-Ning, L. (2010). A three-step purification method for rhBMP-2 produced in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*.
- Shim, Y., Kim, Y., Choi, Y., & Jang, J. (2013). *Estados Unidos Patente nº US 2013/0060012 A1*.
- Tejeda, A., Montesinos, R. M., & Guzmán, R. (1995). *Bioseparaciones*. Mexico: Editorial Unison.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L., . . . Gstraunthaler, G. (Marzo de 2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24, 1053-1063.
- Vergara, M., Becerra, S., Díaz-Barrera, Á., Berrios, J., & Altamirano, C. (Noviembre de 2012). Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(6), 1-9.
- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P., Baer, G., & Kadouri, A. (2003). Potential of Cell Retention Techniques for Large-Scale High Density Perfusion Culture of Suspended Mammalian Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 751-765.
- Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. Great Britain: Wiley.
- Zhang, J. (2010). Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production. En R. Baltz, J. Davies, & A. Demain, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Third Edition ed., págs. 157-178). Washington, United States: American Society of Microbiology.
- Zhou, J.-J. A. (2008). *Enhancing Production of Recombinant BMP-2 In Mammalian Cell Culture Systems By Inhibition of Pro-protein Cleavage Using 9DR Peptides*. Thesis, University of Toronto, Faculty of Dentistry, Toronto.

CAPÍTULO 4

BALANCES DE MATERIAL Y ENERGÍA

El presente capítulo tiene como objetivo describir cada uno de los flujos involucrados de forma directa en la producción de *rhBMP-2* a partir de células CHO, determinando la magnitud y composición de cada una de las corrientes según el proceso descrito en “Síntesis y Selección de Procesos” presente en el Capítulo 3.

La planta ha sido diseñada para producir 1537 [mg] de *rhBMP-2* al año, con el fin de abarcar el 35% de la demanda internacional estimada hasta el año 2023, según lo señalado en el “Estudio de Mercado” desarrollado en el Capítulo 2; lo cual será utilizado como base de cálculo para determinar la materia prima necesaria y los requerimientos del proceso considerando los rendimientos de cada una de las etapas.

Con el fin de facilitar el desarrollo de este Capítulo, es que se presenta la Figura 4.1: Diagrama de Bloques para la producción de *rhBMP-2* en células CHO, para así detallar e identificar cada una de las corrientes del proceso, el cual será desglosado con el objetivo de ser analizado y desarrollado por partes, posterior a la descripción del proceso de propagación de la línea celular a utilizar.

Un aspecto importante a considerar es que la etapa de producción, que se refiere principalmente a la fermentación es un proceso continuo, mientras que las etapas posteriores de recuperación y purificación son discontinuas, lo que implica que debe existir una coordinación entre las etapas con el fin de lograr una operación en armonía de ambas partes del proceso.

Finalmente, cabe señalar que el desarrollo de los balances de materia de la fermentación como sistema de perfusión, han sido desarrollados en función de un modelo matemático que considera las variables de mayor influencia en el crecimiento de la línea celular a utilizar, considerando la variación de algunos parámetros cinéticos por efecto de la temperatura, la inhibición por producto que generan algunos desechos metabólicos y la utilización simultánea de glucosa y glutamina como fuente de carbono y energía.

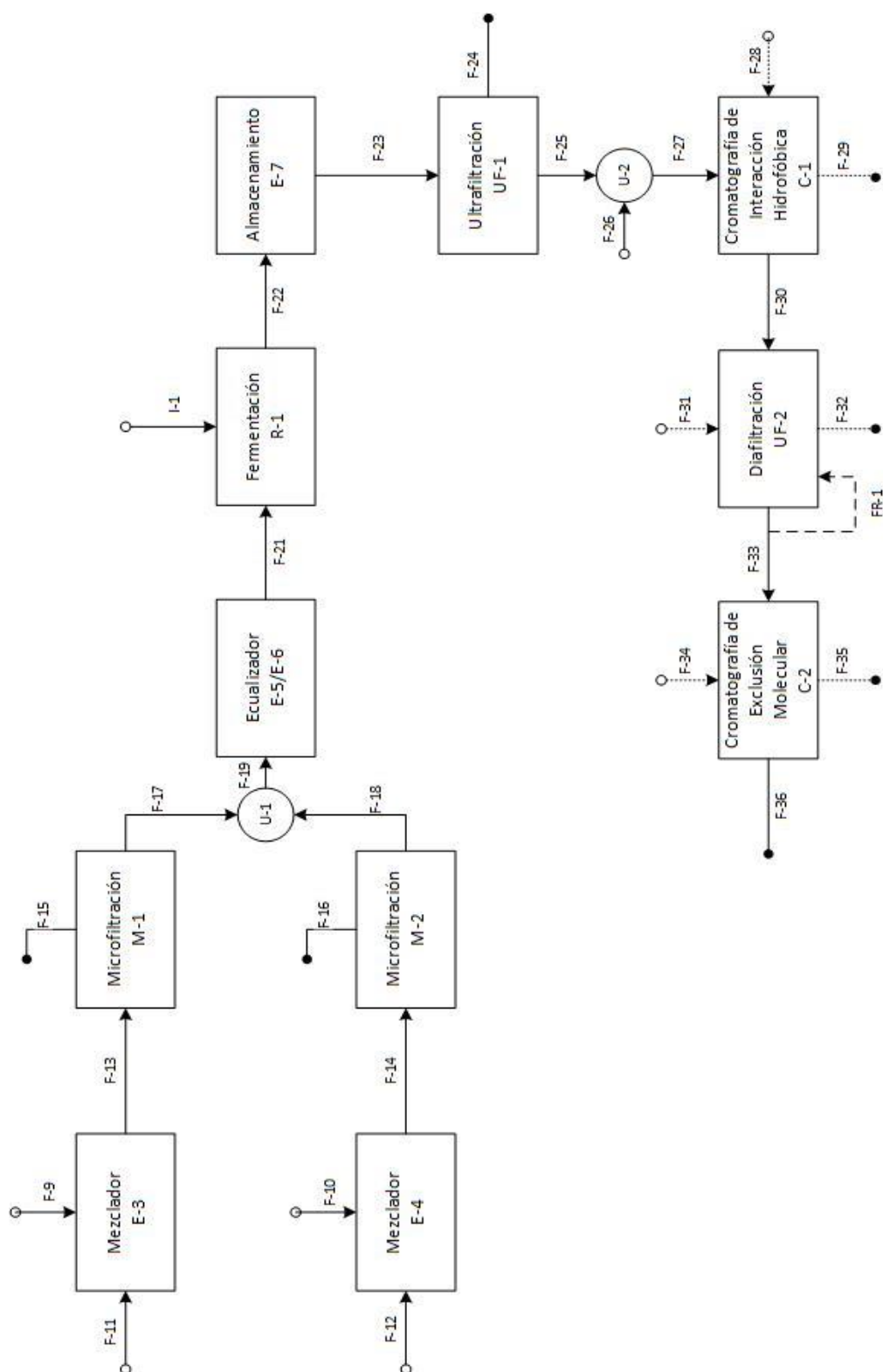


Figura 4.1: Diagrama de Bloques para la producción de *rhBMP-2* en células CHO.

4.1 ETAPA DE PROPAGACIÓN

La propagación del inóculo se realiza a partir de un criovial del banco celular de trabajo, realizando cultivos sucesivos aumentando el volumen de reacción hasta alcanzar el número de células que permita inocular el fermentador a una concentración celular de 0,063 [mg/mL] equivalente a $2 \cdot 10^5$ [células/mL], según un peso seco de 0,315[mg]/ 10^6 [células] (Altamirano *et al.*, 2001), es decir un 20% de lo que se pretende llegar al final del cultivo por lotes.

Se estima que la concentración celular inicial de un criovial de trabajo es de 2,52 [mg/mL] ($8 \cdot 10^6$ [células/mL]). Los crioviales poseen un volumen de 2 [mL] y la viabilidad de cada cultivo corresponde a un 75% en la etapa siguiente al descongelamiento y dilución del criovial y de un 95% para cada etapa posterior (Barros, Hurtado, Altamirano, & Illanes, 2005).

Con esta información es que se realiza el protocolo de propagación descrito en la Tabla 4.1. Se aclara que para la presentación de datos en todo este trabajo, se considera la aproximación a la quinta cifra significativa y truncando cuando las últimas cifras sean cero.

Tabla 4.1: Protocolo de propagación para obtener el inóculo del reactor.

Volumen [mL]	Concentración Inicial [mg/mL]	Viabilidad [%]	Concentración Inicial de Células Viables [mg/mL]	Tiempo de Cultivo [d]	Concentración Celular Final [mg/mL]
2	2,52	-	-	-	2,52
10	0,504	75	0,378	1,5	0,74166
100	0,07417	95	0,07046	2,5	0,27071
500	0,05414	95	0,05143	2,5	0,21254
2000	0,05314	95	0,05048	2,5	0,20943
4000	0,10471	95	0,09948	2,5	0,34847

De esta forma se obtiene a partir de un criovial de trabajo, el inóculo para iniciar la etapa de operación por lotes en el reactor con una concentración de 0,056 [mg/mL], ($1,78 \cdot 10^5$ [células/mL]) que si bien es menor a lo esperado, es suficiente para iniciar el cultivo por lotes.

Para llevar a cabo el protocolo de propagación es necesario utilizar un total de 6,62 [L] de medio de cultivo en seis etapas (una etapa de descongelamiento y dilución, y cinco de cultivos), y el proceso completo debiera demorar un total de 11,5 [d].

El esquema del protocolo de propagación se presenta a continuación en la Figura 4.2.

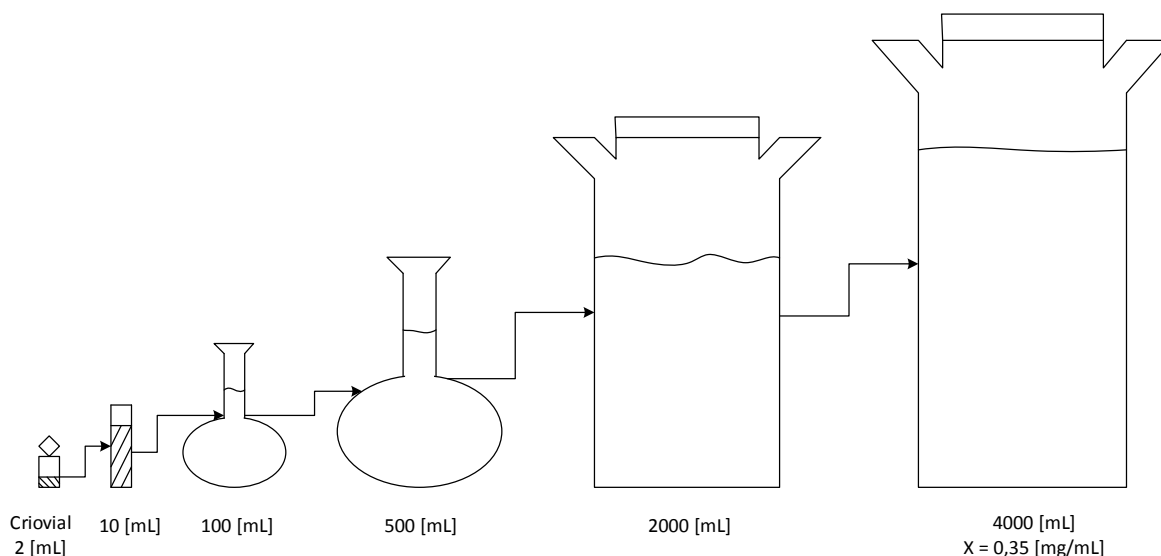


Figura 4.2: Esquema de propagación.

4.2 ETAPA DE PRETRATAMIENTO

4.2.1 Estanques de Mezclado (E-3/E-4) y Microfiltros de Esterilización (M-1/M-2)

Esta etapa consiste en la preparación del medio de cultivo en polvo, su homogenización y posterior esterilización. Para realizar todo esto, el medio de cultivo en polvo es alimentado a un estanque de mezclado (E-3) a través de la corriente F-11, en el cual se mezcla con agua tipo I que ingresa por la corriente F-9. El estanque E-3 cuenta con agitación que permite una correcta dispersión, solubilización y homogenización del medio en polvo.

Se prepararán 62,5 [L] de medio de cultivo por vez, correspondientes al medio necesario para un día de operación en cultivo continuo en perfusión con una tasa de dilución fija a 2,5 [d⁻¹]

Una vez constituido el medio de cultivo líquido, sale por la corriente F-13 para ser esterilizado a través de un microfiltro (M-1) de 0,1 [μm], con el fin de retener cualquier tipo de microorganismo que pudiera afectar la seguridad del proceso, separándose en dos corrientes: el permeado (F-17) que corresponde al medio de cultivo esterilizado y el retenido (F-15) que corresponde a la purga de todos los contaminantes que van siendo capturados por la membrana. Es necesario aclarar que F-15 es una corriente de magnitud muy pequeña y poco relevante para el proceso por lo que no será caracterizada.

En la Figura 4.3, se muestran dos líneas en paralelo las cuales son idénticas y operan de forma simultánea ingresando medio de cultivo a través de la corriente F-11 o F-12, según corresponda. El objetivo de mantener dos líneas operativas en esta sección, es asegurar que la preparación de medio de cultivo sea constante con el objetivo de que no se interrumpa la alimentación del cultivo continuo producto de fallas en la homogenización del estanque o por problemas de operación del microfiltro que conlleve a contaminación de uno de los flujos. De esta forma E-3 es idéntico en diseño a E-4, al igual que M-1 a M-2. Las corrientes F-11 y F-12 son equivalentes en magnitud y composición, así como F-9 lo es con F-10, F-13 con F-14, F-15 con F-16 y F-17 con F-18.

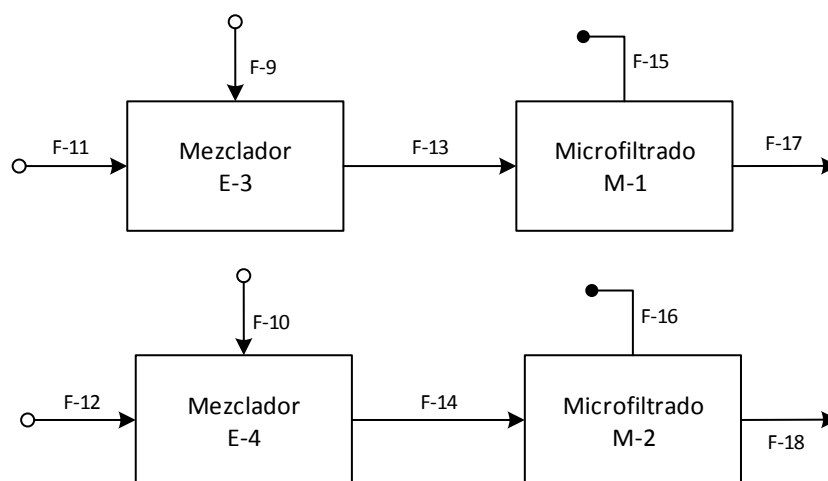


Figura 4.3: Diagrama de bloques para etapa de preparación del medio de cultivo.

Antes de continuar con la descripción de las corrientes del proceso, es necesario aclarar que el medio de cultivo IMDM es un producto que posee cantidades establecidas de nutrientes específicos (ver Tabla 3.1), por lo que para efectos de caracterización no tiene sentido determinar la composición de cada uno de los nutrientes que componen su fórmula comercial, sin embargo es necesario realizar balances a compuestos claves del medio que son parámetros de crecimiento de la línea celular, por lo que se considerarán dentro de los balances los compuestos que constituyan fuentes de carbono y energía para las células, es decir glutamina y glucosa, mientras que sales inorgánicas, vitaminas y otros compuestos presentes en baja cantidad, no serán considerados.

A continuación, en la Tabla 4.2 se caracterizan las corrientes de la etapa del proceso descrita. En ella se presenta la cantidad de Agua tipo I que se debe utilizar y la masa de glucosa y glutamina que

pasarán al reactor. En esta etapa sólo se mezcla agua y medio de cultivo comercial, es por esto que no se especifican composiciones ni concentraciones en las corrientes, ya que vienen dadas por la formulación del medio IMDM.

Tabla 4.2: Descripción de corrientes de preparación de medio de cultivo.

	F-9/F-10	F-11/F-12	F-13/F-14	F-17/F-18
Agua Tipo I [l]	125	0	125	125
Glucosa [g]	0	562,5	562,5	562,5
Glutamina [g]	0	73	73	73

4.2.2 Unión de Corrientes (U-1)

Como ya se mencionó anteriormente las líneas de procesos que incorporan las corrientes F-17 y F-18 operan de forma simultánea, sin embargo, no existe una unión real de dichas corrientes, sino que ambas ingresan por separado al estanque. Es por esto que la unidad U-1 no será considerada dentro del balance de masa propiamente como tal, sin embargo es mencionada ya que de todas formas se mezclan las corrientes al interior del estanque E-5.

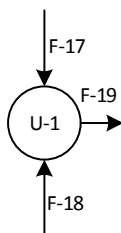


Figura 4.4: Diagrama para la unión de corrientes F-17 y F-18.

Dado el caso de unión, la composición de la corriente F-19 quedaría determinada por las siguientes ecuaciones, aplicando la primera para cada uno de los compuestos a determinar.

$$F_{17} * C_{17} + F_{18} * C_{18} = F_{19} * C_{19} \quad (Ec. 2)$$

$$F_{17} + F_{18} = F_{19} \quad (Ec. 3)$$

Donde F es el Flujo de cada corriente [Volumen por unidad de tiempo] y C corresponde a la concentración de cada compuesto y en cada corriente [Masa por unidad de Volumen].

4.2.3 Estanques de Retención (E-5 y E-6)

La corriente F-19 constituida por medio de cultivo estéril, es llevada a un estanque de retención para así poder entregar un flujo de alimentación constante al reactor una vez iniciado el cultivo continuo. En la realidad se operan dos estanques: E-5, que busca retener el medio de cultivo durante dos días con el fin de esperar los resultados de los análisis microbiológicos para comprobar si la mezcla se ha contaminado, y E-6 que opera en el caso de que sea seguro utilizar el medio, recibiendo la mezcla para distribuirla con un flujo continuo hacia el reactor y liberando a E-5 para que pueda recibir medio para análisis nuevamente. De modo que las composiciones de las corrientes F-19 y F-21 son iguales, sin embargo lo que varía son las velocidades (flujos) de entrada y salida, donde la corriente F-19 es intermitente, y la corriente F-21 es continua.

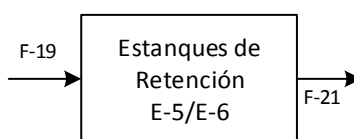


Figura 4.5: Diagrama de bloques para estanque ecualizador E-3.

A continuación se muestra la Tabla 4.3, en donde se caracterizan las corrientes asociadas a los estanques E-5 y E-6.

Tabla 4.3: Descripción de corrientes de estanques de retención.

	F-19	F-21
Agua [l]	250	Corriente continua descrita en Tabla 4.9
Glucosa [g]	1125	
Glutamina [g]	146	

4.3 ETAPA DE PRODUCCIÓN

Para esta etapa es necesario diferenciar los procesos del espacio físico en el que ocurren, ya que si bien toda la etapa de producción se lleva a cabo en el reactor (R-1), se distinguen dos modalidades de operación distintas que cumplen funciones diferentes dentro del desarrollo del cultivo y de la producción de *rhBMP-2*: Operación en cultivo por lotes y cultivo continuo en perfusión.

Antes de abarcar cada una de estas modalidades, se explicará la metodología desarrollada para presentar los balances, junto a las consideraciones realizadas y modelos matemáticos desarrollados.

4.3.1 Estimación del Volumen de Reactor

De acuerdo a la masa de *rhBMP-2* que se debe producir anualmente según el mercado que se quiere abarcar (M), el número de cultivos que se realiza anualmente (L), la concentración celular durante la fase estacionaria de producción (X), la productividad específica de *rhBMP-2* (q_{BMP}), el rendimiento global de las etapas de recuperación y purificación (R) y el tiempo de cultivo de la fase estacionaria (t) se determina el volumen útil del reactor (V) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V = \frac{M}{q_{BMP} * X * R * t * L} \quad (Ec. 4)$$

Esta ecuación plantea utilizar información que aún no ha sido calculada como la concentración celular que se alcanza en el reactor según el modelo cinético que se plantea más adelante, por lo que para resolver este problema (considerando que el volumen del reactor debe ser aproximado, según la disponibilidad en el mercado), es que se estima de forma gruesa asignando valores a cada parámetro según lo que se pretende alcanzar.

Luego una vez estimado el volumen, se procede a realizar cada balance y a determinar las variables y el comportamiento del cultivo a lo largo del tiempo; así una vez obtenido estos valores es que se recalcula el volumen del reactor. En el caso de que la variación sea muy grande, se debe proceder a realizar nuevamente los cálculos desarrollados y volver a estimar un nuevo volumen. En caso de que la variación sea pequeña y mientras se ajuste al volumen seleccionado de reactor según la disponibilidad en el mercado, entonces se establece como volumen definitivo, resolviendo finalmente la determinación del volumen útil del reactor con un tanteo simple.

Para determinar el número de cultivos a realizar durante un año (335 días de trabajo) y el tiempo que dura la fase estacionaria se utilizan tres criterios:

1. El tiempo de cultivo en fase estacionaria total (sumando el de todos los cultivos realizados en un año de producción) debe ser máximo, con el fin de aumentar el tiempo de producción de la proteína de interés.

2. A su vez, la cantidad de lotes a realizar en un año debe ser la mayor posible, para minimizar los riesgos de contaminación o que en caso de ocurrir contaminación de algún lote, la pérdida signifique la menor cantidad de producto posible.
3. La capacidad de los sistemas de perfusión es una limitante al momento de estimar el volumen de reacción, ya que la tasa de dilución se define en función del volumen. La ventaja de los sistemas de perfusión es que permite operar sistemas con tasas de dilución mayores a $\mu_{\text{máx}}$ sin provocar el lavado del cultivo. Para este caso se consideró un límite para el sistema de perfusión de una tasa de dilución igual a 2,5, según lo definido por el equipo seleccionado en la Sección 5.2.1

Considerando que la velocidad de crecimiento específica de las células animales es baja en comparación a otros tipos de células, registrando valores para $\mu_{\text{máx}}$ cercanos a $0,7 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ se puede estimar gruesamente un tiempo de cultivo por lotes de 3 días hasta alcanzar la concentración esperada de $0,315 \text{ [mg/ml]}$ ($1 \cdot 10^6 \text{ [células/ml]}$) utilizando la ecuación 4.9 sin considerar inhibición ni el valor real de μ afectado por la muerte celular, por lo que se agrega un día extra de seguridad para el cultivo por lotes.

Ejemplo de Cálculo:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu * t \rightarrow \ln\left(\frac{0,315}{0,053}\right) = 0,7 * t \rightarrow t = 2,5 \approx 3 \text{ [d]}$$

Es decir, agregando el día de seguridad se estima un total de 4 días para la operación por lotes. Siguiendo la misma idea y simplificando el modelo para la operación continua, se estima que para alcanzar estado estacionario deben transcurrir 11 días de operación. De esta forma se puede construir la Tabla 4.4, siguiendo la siguiente forma de cálculo:

$$\frac{\text{Días de operación por año}}{\text{N° de Lotes}} = \text{Tiempo cultivo}$$

$$\rightarrow \text{Tiempo cultivo} - \text{Tiempo para alcanzar E.E} = \text{Tiempo en E.E}$$

$$\rightarrow \text{Tiempo en E.E} * \text{N° de Lotes} = \text{T.F.E Total}$$

Ejemplo de Cálculo: Considerando 335 días de trabajo por año y 6 lotes.

$$\frac{335}{6} \approx 55 \rightarrow 55 - 15 \approx 40 \rightarrow 40 * 6 = 240 \text{ [d]}$$

Tabla 4.4: Estimación del número de lotes a producir en un año y del tiempo en fase estacionaria.

Número de Lotes	Tiempo de Cultivo [d]	Tiempo Fase Estacionaria [d]	Tiempo Fase Estacionaria Total [d]
1	335	320,00	320
2	167	152,00	304
3	111	96,00	288
4	83	68,00	272
5	67	52,00	260
6	55	40,00	240
7	47	32,00	224
8	41	26,00	208
9	37	22,00	198
10	33	18,00	180

Considerando las restricciones impuestas anteriormente se puede ver que produciendo seis lotes por año, se cumplen ambas condiciones.

Luego reemplazando por primera vez en la ecuación de volumen con las estimaciones realizadas tenemos:

$$V = \frac{M}{q_{BMP} * X * R * t * L} = \frac{1537 [mg_{rhBMP2}]}{0,000101587 \left[\frac{mg_{rhBMP2}}{mg_{cel} * d} \right] * 3,15 \left[\frac{mg_{cel}}{mL} \right] * 0,7 * 40 [d] * 6}$$

$$V = 28590 [mL] \approx 30 [L]$$

Luego de realizar los cálculos correspondientes y recalculer los valores de X, R y t se obtiene:

$$V = \frac{M}{q_{BMP} * X * R * t * L} = \frac{1537 [mg_{rhBMP2}]}{0,000101587 \left[\frac{mg_{rhBMP2}}{mg_{cel} * d} \right] * 3,37 \left[\frac{mg_{cel}}{mL} \right] * 0,77832 * 41 [d] * 6}$$

$$V = 23448 [mL] \approx 25 [L]$$

A partir de la primera estimación se realizaron los primeros balances de masa, sin embargo una vez planteados los modelos se evidenció que el volumen podía disminuirse, a lo que sumado a la disponibilidad de equipos con la tecnología que se plantea utilizar, es que se decidió probar el modelo propuesto utilizando un volumen útil de 25 [L]. Finalmente, se obtienen buenos resultados

por lo que se decide mantener el volumen calculado luego de comparar con los valores recalculados de los parámetros para la estimación del mismo.

Fijando el volumen del reactor, y teniendo en cuenta la tasa de dilución máxima que soporta el equipo, es que se determina el volumen de perfundido por día.

$$D = 2,5 \left[\frac{1}{d} \right] \rightarrow F = D * V \rightarrow F = 62,5 \left[\frac{L}{d} \right]$$

4.3.2 Desarrollo de modelos matemáticos y métodos numéricos

Para realizar los balances de materia en las distintas etapas de la fermentación, la velocidad específica de crecimiento celular (μ) es modelada como una variable dependiente de las concentraciones de glucosa, glutamina, lactato y amonio (estos dos últimos considerados como inhibidores del sistema), según el modelo de W. Miller y colaboradores (Miller, Blanch, & Wilke, 1988) que se muestra a continuación:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{glc}} \cdot \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{gln}} \cdot \frac{K_{lac}}{[Lac] + K_{lac}} \cdot \frac{K_{NH_4^+}}{[NH_4^+] + K_{NH_4^+}} \quad (Ec. 5)$$

A su vez, se propone utilizar como modelo para la velocidad específica de muerte celular (μ_d) una función de la concentración de lactato y de amonio de acuerdo a lo expuesto por B.Batt y D. Kompala (Batt & Kompala, 1988):

$$\mu_d = k_d \cdot \frac{[Lac]}{[Lac] + K_{dlac}} \cdot \frac{[NH_4^+]}{[NH_4^+] + K_{NH_4^+}} \quad (Ec. 6)$$

Al desarrollar los balances correspondientes a la etapa de cultivo continuo, se obtiene que la solución analítica de la ecuación diferencial planteada es acotada a un diferencial de tiempo pequeño, por lo que no puede utilizarse para obtener los parámetros finales del cultivo, de esta forma es que se plantea la utilización de la recursividad como método numérico combinado con la solución analítica para un diferencial de tiempo pequeño para plantear el modelo cinético de los cultivos.

Es así que para construir la simulación de cada una de las etapas se desarrolló la siguiente metodología:

1. Se plantea la ecuación diferencial que rige el comportamiento del cultivo.
2. Se obtiene una solución analítica a través del programa Wolfram Mathematica® 8.
3. Se utiliza el programa Microsoft Office Excel® para graficar las ecuaciones planteadas.
 - a. Se genera una iteración de condiciones iniciales, es decir, la variable en el tiempo “i” sirve de condición inicial para ejecutar la solución analítica encontrada y así determinar el valor de la variable en el tiempo “i+1”.
 - b. En cuanto a la dependencia de las variables, se tiene que μ y μ_d dependen de los sustratos y productos, y a su vez los sustratos y productos dependen de μ y μ_d . Para solucionar este problema se establece que las variables μ y μ_d en el tiempo “i+1” dependerán de las concentraciones de glucosa, glutamina, lactato y amonio en el tiempo “i”, y que las concentraciones en el tiempo “i+1” dependerán de μ y k_d en el tiempo “i+1”.
 - c. La diferencia de tiempo que transcurre entre cada iteración debe ser lo más pequeña posible para minimizar el error. Para el caso de células animales que poseen un metabolismo lento es suficiente utilizar un $\Delta t = 0,02$ [d].

Las condiciones iniciales para la operación por lote, están dadas por la composición del medio de cultivo, asumiendo que no hay productos metabólicos al inicio del cultivo y suponiendo que para un $t = 0$ [d] el cultivo crece a una velocidad aparente definida por $\mu^* = \mu_{\text{máx}}$ y $k_d = 0$ [d⁻¹].

Las condiciones iniciales para la operación continua en perfusión están dadas por las condiciones finales de la operación por lote.

Retomando la caracterización de las corrientes, hasta ahora los balances se han realizado considerando la operación en modalidad de cultivo continuo en perfusión, sin embargo la puesta en marcha considera una etapa previa de cultivo por lote cuyo fin es generar la biomasa suficiente para hacer viable el cultivo continuo.

4.3.3 Modalidad de Cultivo por Lote

A continuación se desarrollan los balances correspondientes a la modalidad de cultivo por lote, comenzando con la caracterización de las corrientes ubicadas antes de R-1 y que ya fueron explicadas en la Sección 4.2.

Tabla 4.5: Descripción de corrientes en Cultivo por Lotes.

	F-21	I-1	F-22
Agua [l]	21	4	
Biomasa [g]	0	1,39390	
Glucosa [g]	105,49936	7,00064	
Glutamina [g]	13,86709	0,73291	N/A
Lactato [g]	0	8,19800	
Amonio [g]	0	0,14768	
rh BMP-2 [mg]	0	0,20258	

Los datos utilizados para realizar los balances de materia válidos para ambas etapas del proceso, se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Valores de constantes utilizados para el modelo de balance de masa.

Símbolo	Valor	Unidad	Referencia
$\mu_{\text{máx}}$	0,7	[d ⁻¹]	(Xing, Bishop, Leister, & Jian Li, 2010)
k_d	0,38	[d ⁻¹]	(Xing et al., 2010)
V	25	[L]	Sección 4.3.1
q_{glc}	-2,75794286	[mg/mg/d]	(Ahn & Antoniewicz, 2011)
q_{gln}	-0,401955	[mg/mg/d]	(Ahn & Antoniewicz, 2011)
q_{lac}	2,05554	[mg/mg/d]	(Ahn & Antoniewicz, 2011)
q_{NH_4}	0,03702857	[mg/mg/d]	(Ahn & Antoniewicz, 2011)
q_{BMP}	5,08E-05	[mg/mg/d]	(Zhou, 2008)
K_{glc}	0,0151	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)
K_{gln}	0,0069	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)
K_{lac}	3,8734	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)
K_{NH_4}	0,1172	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)
K_{dlac}	4,1257	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)
K_{dNH_4}	0,1172	[mg/mL]	(Xing et al., 2010)

Una concentración adecuada para dar inicio a un cultivo en perfusión es de $1 \cdot 10^6$ [células/mL] que equivale a 0,315 [mg/mL]. Las condiciones de concentración celular fijadas para determinar el tiempo de operación por lote se especifican en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Condiciones de inicio y término del cultivo por lote.

Símbolo	Valor	Unidad
X_0	0,053	[mg/mL]
X_F	0,315	[mg/mL]

Las ecuaciones de balance resultan las siguientes:

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X(t) \cdot V \quad (Ec. 7)$$

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = q_S \cdot X(t) \cdot V \quad (Ec. 8)$$

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = q_P \cdot X(t) \cdot V \quad (Ec. 9)$$

Donde “V” corresponde al volumen de reacción que se mantiene constante, “X” es la concentración celular, “S” corresponde a la concentración de un sustrato cualquiera, “P” es la concentración de un producto metabólico cualquiera y “q” corresponde a la velocidad específica de consumo/producción según sea el caso.

Ejecutando la metodología propuesta en la Sección 4.3.2, se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$X_i = X_{(i-1)} \cdot \exp\left((\mu_i - \mu_{d_i}) \cdot \Delta t\right) \quad (Ec. 10)$$

$$S_i = S_{i-1} + q_S \cdot X_i \quad (Ec. 11)$$

$$P_i = P_{i-1} + q_P \cdot X_i \quad (Ec. 12)$$

Las condiciones iniciales para la operación por lote, están dadas por la composición del medio de cultivo, asumiendo que no hay productos metabólicos al inicio del cultivo y suponiendo que para un $t = 0$ [d] el cultivo crece a una velocidad aparente definida por $\mu = \mu_{\text{máx.}}$ y $\mu_d = 0$.

Por ensayo y error se ha realizado el procedimiento repetidas veces y se obtiene que la concentración final necesaria para que la etapa de perfusión sea viable se alcanza a los 1,92 [d]; sin embargo, si se extiende la operación por lote para obtener una mayor biomasa al momento de iniciar el cultivo en perfusión, se alcanza el estado estacionario en menor tiempo. Es por esta razón que se ha decidido terminar la operación en lote a los 3 [d], alcanzando una concentración de células de 0,2539 [mg/mL] equivalente a $8,06 \cdot 10^5$ [células/mL], a pesar de que es una concentración menor a la propuesta inicialmente de 0,315 [mg/mL] ($1 \cdot 10^6$ [células/mL]) es suficiente para comenzar la operación en perfusión. Las concentraciones remanentes de sustratos y productos se utilizan como condiciones iniciales de la etapa en perfusión para fijar los valores de μ y μ_d .

En la Figura 4.6 se muestra el desarrollo del cultivo y en la Figura 4.7 se muestra el comportamiento de cada variable por separado a lo largo de la operación en lote.

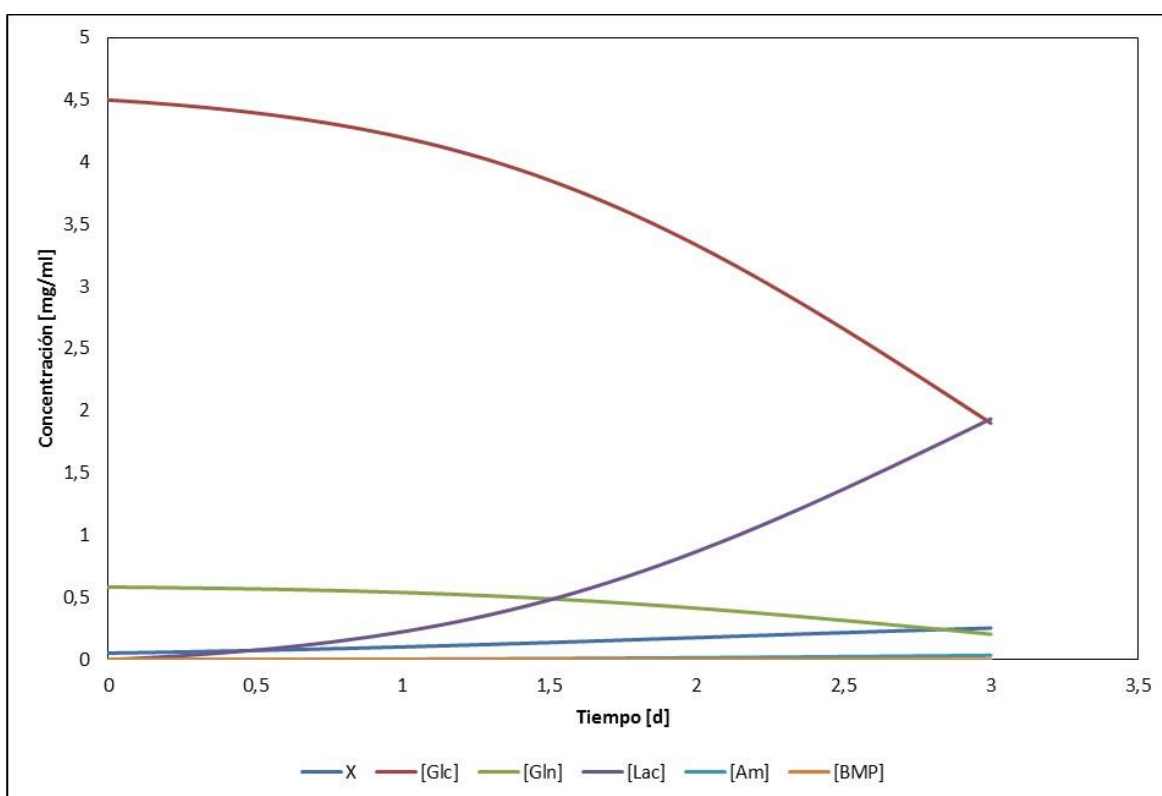


Figura 4.6: Comportamiento del cultivo por lote.

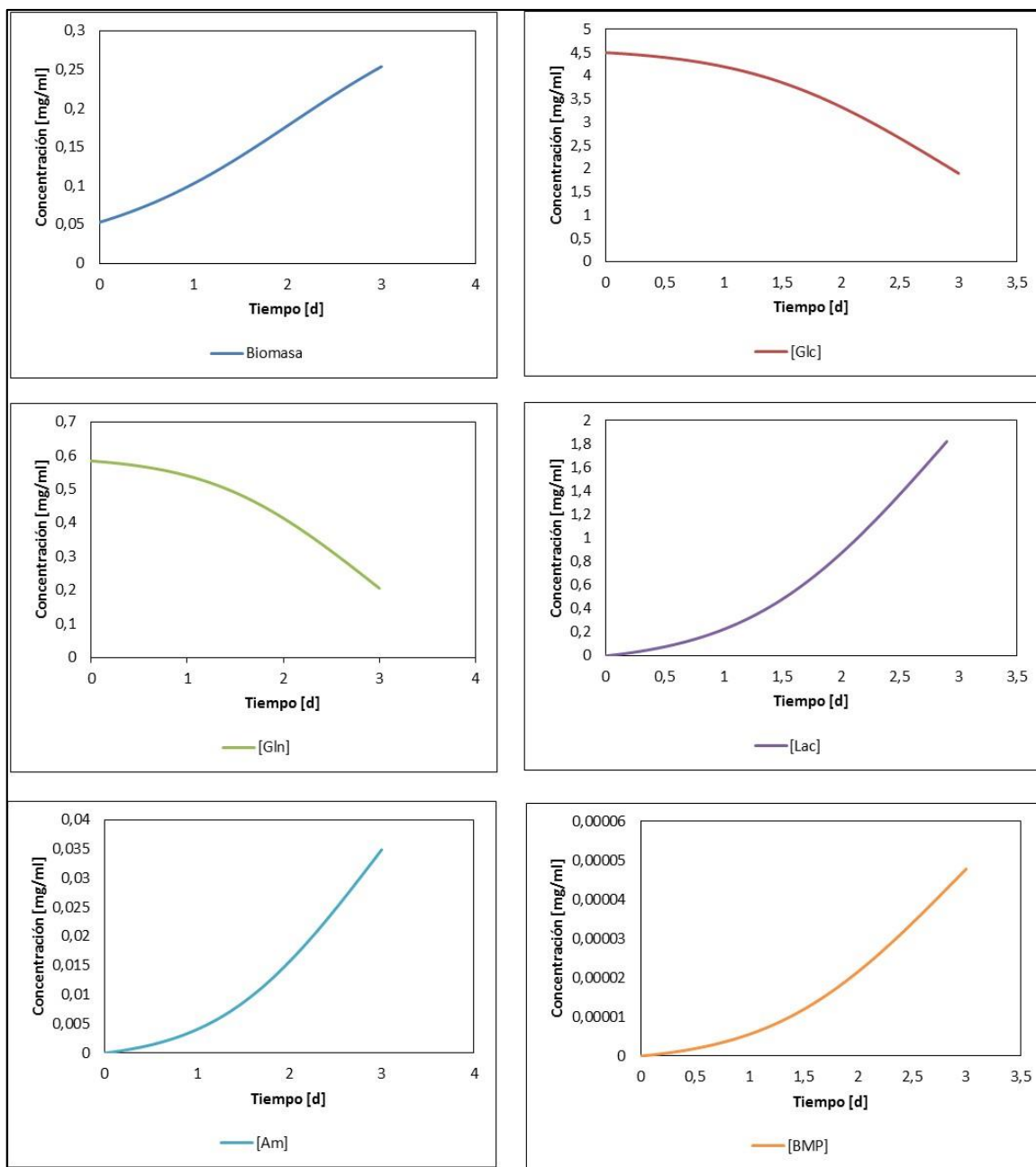


Figura 4.7: Comportamiento de las concentraciones de biomasa, sustratos y productos metabólicos durante la etapa de operación por lote.

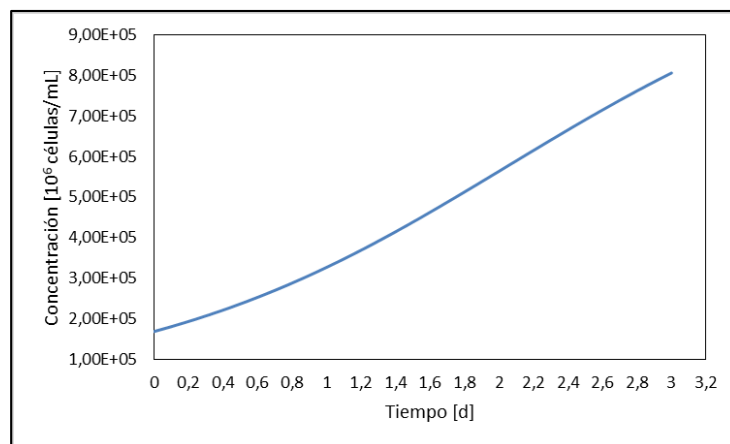


Figura 4.8: Comportamiento de la concentración de biomasa durante la etapa de operación por lote, expresada en número de células por unidad de volumen.

4.3.4 Balance de Materia para la Etapa de Perfusión

Para realizar los balances de materia en el reactor, es importante contar con un diagrama en el que se identifiquen las entradas y salidas del reactor para el planteamiento de un balance global, y luego de balances para cada equipo del sistema productivo. El diagrama que se presenta en la Figura 4.8 explica el funcionamiento de un sistema en perfusión tradicional, sin embargo, dadas las características del reactor seleccionado, las entradas y salidas del sistema se llevan a un equipo que posee todo integrado. Este equipo se presenta en el Capítulo 5 y de momento sólo será representado por el diagrama de bloques que muestra la Figura 4.9.

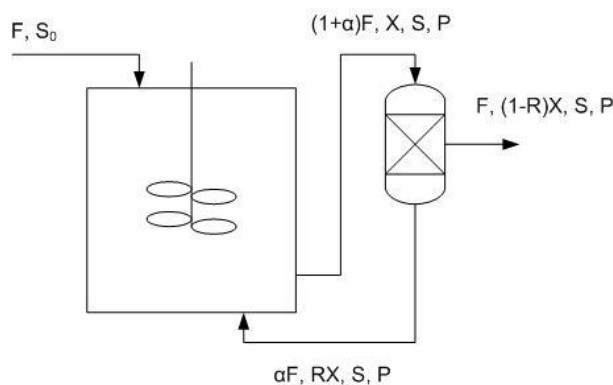


Figura 4.9: Esquema del sistema de producción. Donde “F” es el flujo de alimentación, “ α ” es la fracción de recirculación y “R” es la fracción de retención de la membrana.

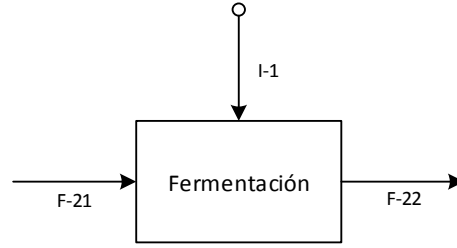


Figura 4.10: Diagrama de bloques para el reactor en cultivo continuo con sistema de perfusión integrado.

El esquema muestra la corriente I-1 correspondiente a la entrada de inóculo, por lo que en operación continua esta corriente posee un flujo de 0 [L/d], mientras que la corriente F-21, si bien es la misma conexión que en la etapa por lotes, al iniciar la operación continua se inicia el bombeo de medio de cultivo por lo que el flujo de esta corriente cambia en cultivo continuo. Los valores para esta corriente en cultivo por lotes se describen en la Tabla 4.5, mientras que para la operación en modalidad continua se presentan en la Tabla 4.9.

Considerando las entradas y salidas del sistema se pueden plantear los balances generales de células, sustratos y productos principales.

$$\frac{d(X \cdot V)}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X(t) - F \cdot (1 - R) \cdot X(t) \quad (Ec. 13)$$

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F \cdot S_0 + q_S \cdot X(t) \cdot V - F \cdot S(t) \quad (Ec. 14)$$

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = q_P \cdot X(t) \cdot V - F \cdot P(t) \quad (Ec. 15)$$

Donde “V” es el volumen de reacción que se mantiene constante. De aquí se define la tasa de dilución como parámetro de la siguiente manera:

$$D = \frac{F}{V} \quad (Ec. 16)$$

Así al ejecutar la metodología descrita en la Sección 4.3.2, se obtienen las siguientes soluciones al sistema de ecuaciones diferenciales:

$$X_i = X_{i-1} \cdot e^{((\mu - \mu_d) - D \cdot (1 - R)) \cdot \Delta t} \quad (Ec. 17)$$

$$S_i = S_0 - \frac{q_S \cdot X_0}{D \cdot R + (\mu - \mu_d)} \cdot e^{-D \cdot \Delta t} - e^{((\mu - \mu_d) - D \cdot (1 - R)) \cdot \Delta t} + e^{-D \cdot \Delta t} \cdot (S_{i-1} - S_0) \quad (Ec. 18)$$

$$P_i = e^{-D \cdot \Delta t} \cdot P_{i-1} - \frac{q_P \cdot X_0}{D \cdot R + (\mu - \mu_d)} \cdot (e^{-D \cdot \Delta t} - e^{((\mu - \mu_d) - D \cdot (1-R)) \cdot \Delta t}) \quad (Ec. 19)$$

En la Tabla 4.8 se muestran los valores fijados para los parámetros utilizados.

Tabla 4.8: Datos considerados para el sistema de perfusión a 37 [°C] y 31 [°C].

Símbolo	Valor	Unidad
D	2,5	[d ⁻¹]
R	0,98	-
Cultivo en Perfusión 37 [°C]		
$\mu_{\text{máx}}$	0,7	[d ⁻¹]
k_d	0,38	[d ⁻¹]
q_{BMP}	5,08E-05	[mg/mg/d]
Cultivo en Perfusión 31 [°C]		
$\mu_{\text{máx}}$	0,49	[d ⁻¹]
k_d	0,266	[d ⁻¹]
q_{BMP}	1,02E-04	[mg/mg/d]

En la Figura 4.11 se muestra el desarrollo del cultivo en perfusión hasta alcanzar estado estacionario.

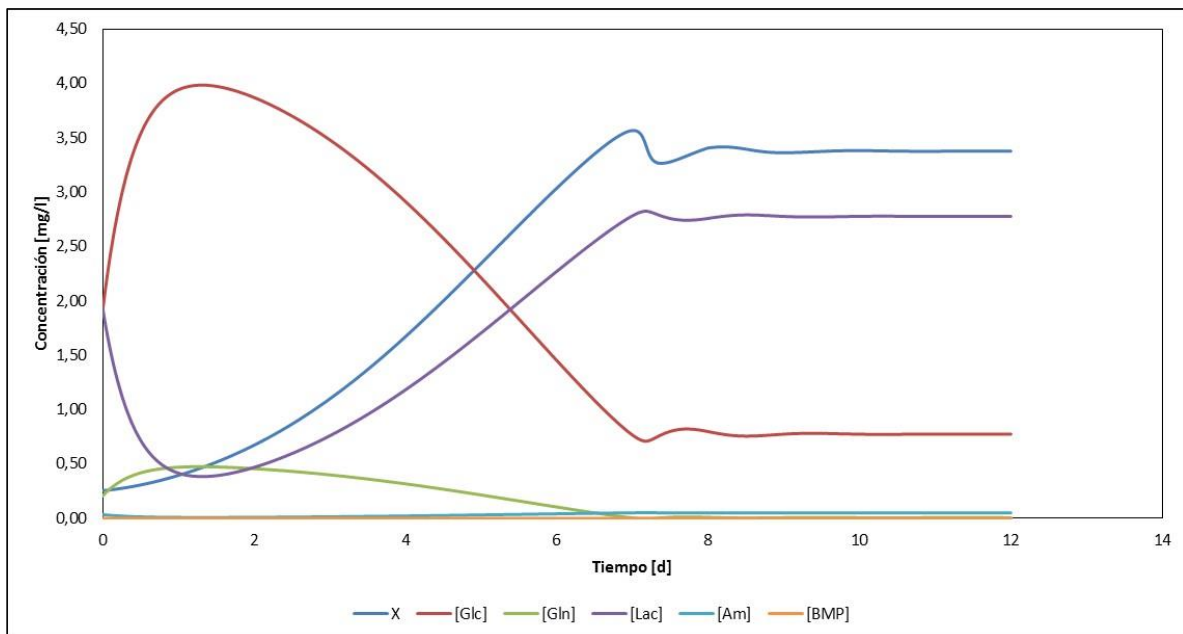


Figura 4.11: Comportamiento del cultivo continuo en perfusión hasta estado estacionario.

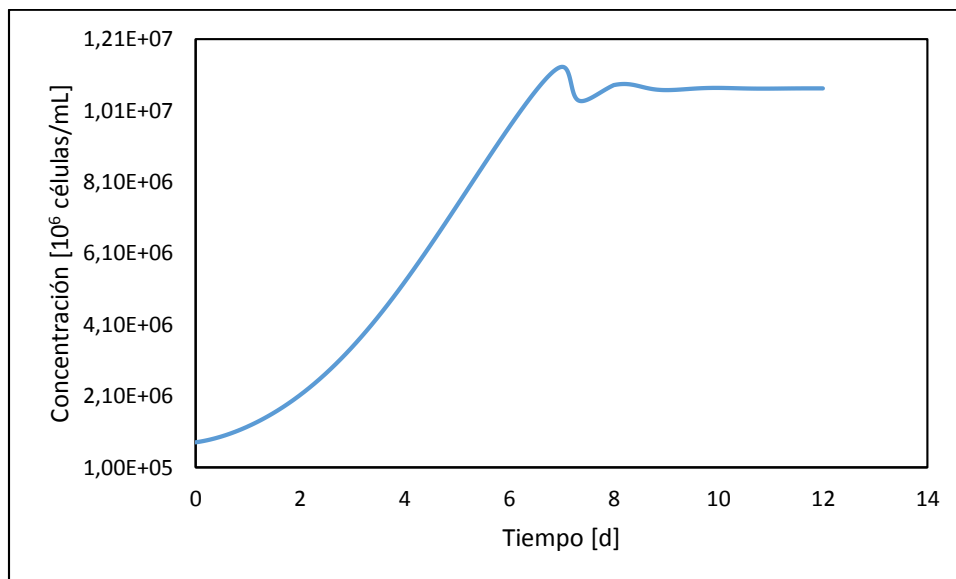


Figura 4.12: Comportamiento de la concentración de biomasa en cultivo continuo en perfusión hasta estado estacionario, expresada en número de células por unidad de volumen.

Así la corriente F-22 puede ser determinada en composición. La corriente I-1 es determinada en función de la etapa de propagación, y F-21 fue determinada en el balance de E-5 y E-6.

En la Tabla 4.9 se muestra un resumen con la composición de las corrientes involucradas en la etapa de producción tanto en operación por lote como continua.

Tabla 4.9: Descripción de corrientes de cultivo continuo.

	F-21	I-1	F-22
Agua [l/d]	62,5		62,5
Biomasa [g/l]	0		0,06755
Glucosa [g/l]	4,5		0,774
Glutamina [g/l]	0,584	N/A	0,00496
Lactato [g/l]	0		2,77705
Amonio [g/l]	0		0,05003
<i>rh BMP-2</i> [mg/ml]	0		0,00014

4.4 ETAPA DE RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN

Hasta el momento se ha trabajado sobre la composición de compuestos claves en la etapa de producción, tales como glucosa, glutamina, lactato, amonio y por supuesto *rhBMP-2*, sin embargo todo el proceso de recuperación y purificación es diseñado en función del producto de interés y de algunos compuestos claves en cada etapa.

Por este motivo de aquí en adelante se desarrollarán balances de masa en función exclusiva de la proteína de interés, describiendo las corrientes involucradas con el mayor detalle posible en consideración de la información que se dispone para cada proceso.

4.4.1 Estanque de Almacenamiento (E-7)

La corriente F-22 que proviene del reactor posee un flujo continuo, mientras que la operación del sistema de recuperación y purificación es discontinuo. Es por esto, que se vuelve necesario mantener un estanque de almacenamiento de medio perfundido para así acumular un volumen suficiente para iniciar las etapas de purificación.

La velocidad de descarga de la corriente F-23 está determinada por la capacidad de carga de la unidad UF-1, y corresponde a 4,6 [l/min] de acuerdo a las especificaciones del equipo seleccionado en la Sección 5.3.1.

Al ser simplemente un estanque de almacenamiento, la corriente F-23 posee la misma composición que la corriente F-22, y el volumen que se acumula para ser descargado es el equivalente a un día de operación, es decir 62,5 [l] de medio perfundido por lo que es en base a éste volumen que se realizan todos los cálculos asociados al balance de masa y diseño de los procesos de purificación que se describen a continuación.

4.4.2 Unidad de Ultrafiltración (UF-1) y Unión de Corrientes (U-2)

La ultrafiltración tiene como función concentrar el medio perfundido con el fin de aumentar la concentración de *rhBMP-2* en solución y facilitar el proceso de purificación. El volumen de entrada se reduce a un 10%, de tal manera que al tratar los 62,5 [l], estos se reducen finalmente a 6,25 [l] de solución. El rendimiento de esta etapa está determinado por el coeficiente de retención de la

membrana seleccionada que es mayor al 99%, con lo que se asegura una pérdida mínima de proteína.

Para simplificar el balance al ultrafiltro, en la Figura 4.13 se muestra un diagrama con las corrientes asociadas al sistema.

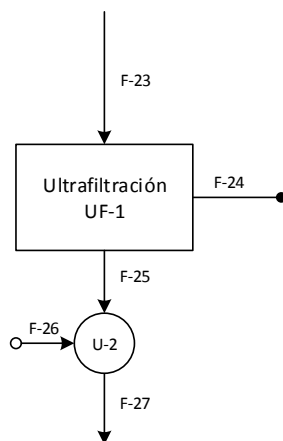


Figura 4.13: Diagrama de bloques de la unidad UF-1 y la unión U-2.

De esta forma, el balance de proteína puede ser expresado por las siguientes ecuaciones:

$$F_{23} * [P]_{23} = F_{24} * [P]_{24} + F_{25} * [P]_{25} \quad (Ec. 20)$$

$$F_{23} = F_{24} + F_{25} \quad (Ec. 21)$$

$$R = \frac{[P]_{25}}{[P]_{23}} = 0,99$$

De forma análoga puede expresarse un sistema homólogo para determinar las concentraciones de glucosa, glutamina, lactato y amonio si suponemos un coeficiente de retención de membrana que tienda a cero; un valor para “R” normalmente estimado para impurezas en general en este tipo de procesos es del 5%.

El balance de agua en este caso guarda relación a lo descrito en la patente del Banco de Hueso de Korea Co. Ltd. (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), en donde se expresa que el volumen del pre-tratamiento de la solución que contiene *rhBMP-2* (comprendido por la ultrafiltración y por la adición de soluciones salinas por la corriente F-26) se reduce en un 90%. Se

ha decidido que el equipo UF-1 reducirá en un 91% el volumen de solución, es decir de los 62,5 [l] provenientes de la corriente F-23, saldrán 5,625 [l] por la corriente F-25 y 56,875 [l] por la corriente F-24.

Posteriormente se agrega una solución de buffer que contiene NaCl y Tris, con el fin de equilibrar el pH de la solución y acondicionarla para pasar a la etapa de cromatografía.

La corriente F-27 debe contener NaCl 1 M y Tris 50 mM, por lo que la solución proveniente de la corriente F-26 que incorpora un volumen de 625 [ml] posee una concentración determinada en función de la dilución de las sales:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (Ec. 22)$$

Ejemplo de Cálculo: Concentración de NaCl.

$$X * 0,625 [L] = 1[M] * (0,625 + 5,625) [L] \rightarrow X = 10 [M]$$

Así se sabe que la concentración en la corriente F-25 debe ser altamente concentrada con NaCl 10 M y Tris 0,5 M.

A continuación se presenta la Tabla 4.10 en donde se describe la composición de todas las corrientes involucradas en la etapa de ultrafiltración.

Tabla 4.10: Descripción de las corrientes de UF-1 y U-2.

	F-23	F-24	F-25	F-26	F-27
Agua [l]	62,5	56,875	5,625	0,625	6,25
Biomasa [g] (Fragmentos)	4,2219	4,0108	0,21109	0	0,21109
Glucosa [g]	48,37495	45,9562	2,41875	0	2,41875
Glutamina [g]	0,30978	0,29429	0,01549	0	0,01549
Lactato [g]	173,56557	164,8873	8,67828	0	8,67828
Amonio [g]	3,12662	2,97029	0,15633	0	0,15633
rh BMP-2 [mg]	8,57783	0,08578	8,4921	0	8,4921
NaCl [g]	0	0	0	365,25	365,25
Tris [g]	0	0	0	37,85625	37,85625

4.4.3 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (C-1)

El protocolo que se realiza en esta etapa involucra la utilización de diferentes soluciones buffer, para equilibrar, cargar, lavar y eluir la proteína de interés con el objetivo de aumentar su pureza. Realizar un balance a las sales contenidas en el buffer de cada etapa resultaría engorroso y de poco interés para entender el proceso; por lo que simplemente el análisis se limitará a evaluar los rendimientos de la proteína de interés en esta etapa, y a determinar los volúmenes de buffer a utilizar en cada una de las etapas, además de la composición de entrada de cada uno de esos buffers.

Para simplificar el cálculo, se considerará que la composición de la solución final obtenida de esta etapa corresponde a una mezcla de la proteína retenida más las sales en las concentraciones establecidas en el último buffer agregado correspondiente al de elución.

A continuación se presenta el diagrama de bloques de la etapa.

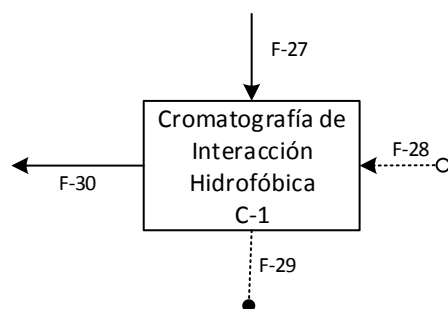


Figura 4.14: Diagrama de bloques de la unidad C-1.

Para realizar el balance de *rhBMP-2* se debe tomar en cuenta que el rendimiento de la etapa fue calculado por Shim y colaboradores (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), el cual será utilizado como referencia y equivale a un 95%, de esta forma el balance puede ser planteado de la siguiente manera:

$$F_{30} * [P]_{30} = 0,95 * F_{27} * [P]_{27}$$

Con respecto a las cantidades de buffer a utilizar para esta etapa, se tiene estandarizada por protocolo la composición de cada solución para cada una de las etapas y el volumen expresado en función del volumen de la columna cromatográfica que equivale a 3,125 [l] (ver sección 5.3.2). En la

Tabla 4.11 se muestra la cantidad y composición de cada solución tampón de acuerdo a la etapa en que es utilizada. De modo que las corrientes F-28 y F-29 no serán determinadas puesto que varían según la etapa de la cromatografía de acuerdo a lo expuesto en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Cantidad y composición de soluciones buffer a utilizar en la cromatografía de interacción hidrofóbica.

	F-28		
	Equilibrado	Lavado	Eluido
Volumen [L]	9,375	9,375	6,25
NaCl [M]	1	0,85	0,6
Tris [mM]	50	50	50
Isopropanol [%pv]	0	3,5	12,5

En la Tabla 4.12 se describe finalmente la corriente F-30.

Tabla 4.12: Descripción de las corrientes de C-1.

	F-27	F-30
Agua [l]	6,25	6,25
Glucosa [g]	2,41875	0
Glutamina [g]	0,01549	0
Lactato [g]	8,67828	0
Amonio [g]	0,15633	0
rh BMP-2 [mg]	8,49205	8,06745
NaCl [g]	365,25	219,15
Tris [g]	37,85625	37,95
Isopropanol [g]	0	755,53469

4.4.4 Diafiltración (UF-2)

La diafiltración es utilizada en este caso para realizar un recambio de buffer, con el fin de reemplazar el isopropanol presente (que proviene del buffer de elución de C-1) por L-arginina y glicerol. En este caso se ha decidido operar mediante ciclos de concentración-dilución (Ver sección 5.3.1).

En la Figura 4.15 se puede observar el diagrama de bloques para la diafiltración, y en la Figura 4.16 se muestra un esquema que explica la configuración de un sistema de diafiltración por concentración-dilución, para entender de forma más acabada el problema.

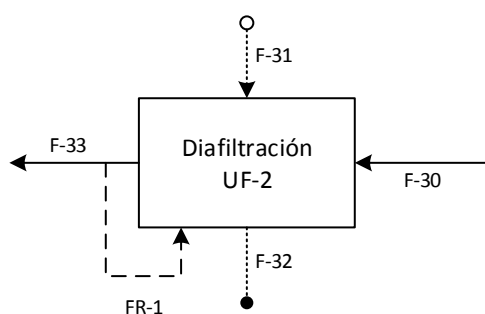


Figura 4.15: Diagrama de bloques para la unidad UF-2.

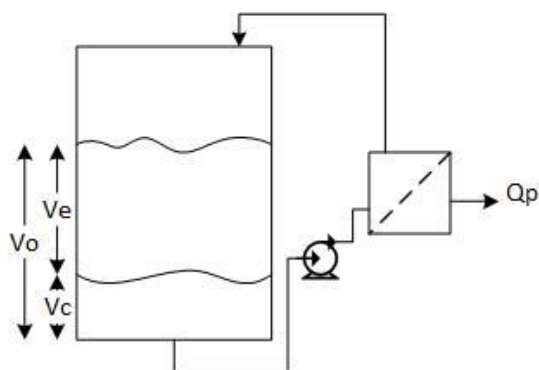


Figura 4.16: Esquema de un sistema de diafiltración. Se procede como una ultrafiltración con el fin de concentrar y reducir el volumen V_o a V_c , pasando todo por una membrana y el retenido es devuelto al sistema; una vez alcanzado el volumen deseado se diluye con agua o buffer, reconstituyendo el volumen perdido V_e , y se vuelve a concentrar y luego se repite nuevamente las veces que requiera.

Así podemos plantear el siguiente balance:

$$C_0^1 = \frac{C_0 * V_c}{V_0} = \frac{C_0 * V_c}{V_c + V_e}$$

Donde,

C_0^1 : Concentración inicial de sales en el estanque, luego de la dilución. V_e : Volumen de eluente agregado.

V_c : Volumen inicial de solución en el estanque de almacenamiento.

$$C_1 = C_0^1 * \left(\frac{V_c + V_e}{V_c} \right)^{R_s}$$

C_1 : Concentración de sales luego de la primera etapa de dilución-concentración.

R_s : Coeficiente de retención de las sales en el sistema de trabajo.

Reemplazando C_0^1 , se obtiene:

$$C_1 = C_0 * \left(\frac{V_c}{V_c + V_e} \right)^{1-R_s}$$

Repetiendo el procedimiento para ciclos sucesivos, se logra generalizar para "n" ciclos:

$$C_n = C_0 * \left(\frac{V_c}{V_c + V_e} \right)^{n*(1-R_s)} \quad (Ec. 23)$$

Donde,

C_n : Concentración de sales luego de la n-ésima etapa de dilución-concentración.

n: Número de ciclos realizados.

De esta forma se determina el número de ciclos en función de reducir la concentración de isopropanol al mínimo y el eluyente a utilizar es el buffer que contiene L-arginina y glicerol. Para ver la determinación del número de etapas y de los parámetros de operación ver Capítulo 5, sección 5.3.1.

El rendimiento de esta etapa es de un 95% (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), de modo que el balance de *rhBMP-2* queda expresado por:

$$F_{33} * [P]_{33} = 0,95 * F_{30} * [P]_{30}$$

La cantidad de eluyente a utilizar viene dado por:

$$V_e \text{ total} = (n - 1) * V_e = (n - 1) * (V_0 - V_c)$$

Debido a que en este caso, además se pretende reducir el volumen de diafiltrado de 6,25 [l] a 41,67 [ml]; siendo el primer valor el volumen inicial y el segundo el volumen de concentrado, luego el volumen total de buffer a utilizar en la diafiltración será de 18,625 [l].

A continuación en la Tabla 4.13 se describen la corriente de salida de la etapa de diafiltración.

Tabla 4.13: Descripción de las corrientes de UF-2.

	F-33
Agua [l]	0,04167
<i>rhBMP-2</i> [mg]	7,66408
NaCl [g]	219,15
Tris [g]	37,95
Isopropanol [mg]	0,00003
L-arginina [M]	0,5
Glicerol [%pv]	5

4.4.5 Cromatografía de Exclusión Molecular (C-2)

Esta unidad corresponde a la última etapa del proceso de purificación, cuyo fin es finalmente obtener un producto en solución lo más puro posible. Consiste en un mecanismo de separación por tamaño, específicamente por peso molecular, y será analizada en esta sección según el diagrama de bloques presentado en la Figura 4.17.

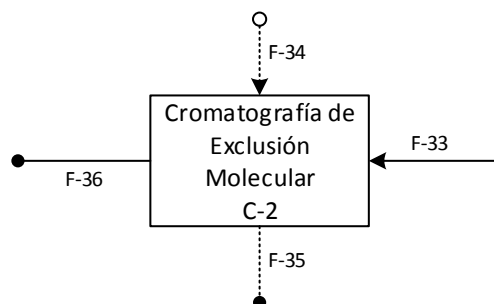


Figura 4.17: Diagrama de bloques para unidad C-2.

La corriente F-33 contiene la masa de *rhBMP-2* recuperada en la diafiltración, F-34 es la corriente que proporciona el tampón de elución, F-35 es la corriente de solución de desecho la cual lleva también un pequeño porcentaje de *rhBMP-2* y F-36 es, finalmente, la corriente que lleva el producto hacia su formulación final.

El rendimiento de esta etapa es de un 88% y la pureza final de la proteína resulta ser de un 95% (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Realizando así un balance de masa a la proteína de interés se plantean las siguientes ecuaciones:

$$F_{36} * [P]_{36} = 0,88 * F_{33} * [P]_{33}$$

Mientras que la masa de contaminantes presentes en la solución viene dado por:

$$F_{36} * [Contaminantes] = 0,05 * \frac{0,88 * F_{33} * [P]_{33}}{0,95}$$

En la Tabla 4.14 se especifica la composición de cada una de las corrientes involucradas en el proceso y la pureza final en la corriente de producto. La corriente F-35 corresponde a la fracción eluída que no interesa, por lo tanto no será caracterizada.

Tabla 4.14: Composición final del producto purificado.

	F-36
<i>rh BMP-2</i> [g]	0,006744389
Contaminantes [g]	0,000354968

4.4.6 Rendimiento Global del Proceso de Recuperación y Purificación

Entendiendo que el rendimiento global de un proceso viene dado por el producto entre los rendimientos de cada una de sus etapas, es que podemos calcular el rendimiento global del proceso de recuperación y purificación.

$$\eta_{global} = \prod \eta_i$$

De modo tal que el rendimiento global del proceso corresponde a un 78,63%, es decir que de los 8,5778 [mg] de *rhBMP-2* que ingresaron en la corriente F-23, se recuperan finalmente 6,7443 [mg] en la corriente F-36.

En cuanto a la pureza alcanzada por el proceso, inicialmente la proteína de interés venía en un medio lleno de contaminantes de diversa índole (sales, proteínas, restos celulares, etc.) con una pureza del 5,7% y finalmente se obtiene una corriente con un 95% de pureza, suficiente para ser comercializado como biofármaco.

4.4.7 Resumen de Corrientes del Proceso.

Se presenta en la página siguiente la Tabla 4.15 que contiene la descripción de cada una de las corrientes involucradas en el proceso a modo de resumen.

4.4.8 Balance de Agua del Proceso.

La realización del balance de agua a utilizar a lo largo del proceso, está sujeta principalmente al diseño de los equipos, sobre todo en lo que concierne al downstream, por lo que los cálculos sobre la cantidad de agua a utilizar son realizados en el Capítulo 5.

4.5 ETAPA DE FORMULACIÓN FINAL

Con respecto a esta etapa no hay mayor balance que realizar, ya que básicamente consiste en distribuir la solución proveniente de la corriente F-36 y disponerla en frascos de acuerdo a las dosis que tendrá el producto. Posteriormente estos frascos son liofilizados, por lo que se espera que el rendimiento de la proteína en esta etapa sea de un 100%.

Tabla 4.15: Resumen de composiciones de corrientes y balances de masa del sistema.

	Pretratamiento			Producción			Recuperación y Purificación							
	F-13/F-14	F-17/F-18	F-19*	F-21*	I-1	F-22*	F-23	F-24	F-25	F-26	F-27	F-30	F-33	F-36
Agua [l]	125	125	250	62,5	4	62,5	62,5	56,875	5,625	0,625	6,25	6,25	0,04167	1,04
Biomasa [g]	-	-	-	-	1,3939	4,2219	4,2219	4,0108	0,21109	-	0,21109	-	-	-
Glucosa [g]	562,5	562,5	1125	281,25	43,75401	48,37495	48,37495	45,9562	2,41875	-	2,41875	-	-	-
Glutamina [g]	73	73	146	36,5	4,58066	0,30978	0,30978	0,29429	0,01549	-	0,01549	-	-	-
Lactato [g]	-	-	-	-	51,23751	173,56557	173,56557	164,8873	8,67828	-	8,67828	-	-	-
Amonio [g]	-	-	-	-	0,92299	3,12662	3,12662	2,97029	0,15633	-	0,15633	-	-	-
rh BMP-2 [mg]	-	-	-	-	1,26611	0,00858	8,57783	0,08578	8,49205	-	8,49205	8,06745	7,66408	6,74439
NaCl [g]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	365,25	365,25	219,15	219,15	-
Tris [g]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,85625	37,85625	37,95	37,95	0,35497
Isopropanol [mg]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	755,53469	-	-
L-arginina [M]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-
Glicerol [%pv]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-

* Corrientes en cultivo continuo. La composición en la operación por lote queda definida en la Tabla 4.5.

4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 4.

- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13, 598-609.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablanco, A., Gámez, X., Cairó, J., & Gòdia, C. (2001). Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17, 1032-1041.
- Barros, I., Hurtado, I., Altamirano, C., & Illanes, A. (2005). *Estudio de Factibilidad Técnico-Económica para la instalación de una planta productora de Eritropoyetina recombinante*. Tesis, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Valparaíso.
- Batt, B. C., & Kompala, D. (1988). A Structured Kinetic Modeling Framework for the Dynamics of Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Continuous Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 515-531.
- Miller, W. M., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1988). A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Batch and Continuous Suspension Culture: Effect of Nutrient Concentration, Dilution Rate, and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 947-965.
- Shim, Y.-B., Kim, Y.-S., Choi, Y.-R., & Jang, J.-W. (2013). *United States Patente nº US 2013/0060012 A1*.
- Xing, Z., Bishop, N., Leister, K., & Jian Li, Z. (2010). Modeling Kinetics of a Large-Scale Fed-Batch CHO Cell Culture by Markov Chain Monte Carlo Method. *Biotechnology Progress*, 26(1), 208-219.
- Zhou, J.-J. A. (2008). *Enhancing Production of Recombinant BMP-2 In Mammalian Cell Culture Systems By Inhibition of Pro-protein Cleavage Using 9DR Peptides*. Thesis, University of Toronto, Faculty of Dentistry, Toronto.

CAPÍTULO 5

BALANCE DE ENERGÍA, DISEÑO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

En este capítulo se presentarán los equipos principales seleccionados para el proceso de producción de *rhBMP-2*, especificando las dimensiones y características técnicas. Estas características se determinarán por medio de cálculos de diseño o bien a través de estimaciones basadas en recomendaciones de los proveedores de equipos o datos bibliográficos. Para comprender de mejor forma la propuesta de producción se presenta un diagrama de flujo al final de esta sección (ver Figura 5.19).

5.1 PROPAGACIÓN

En el caso de la etapa de propagación, tal como se menciona en los Capítulos 3 y 4, se comienza a partir de criviales, por lo que se requiere la utilización de botellas T-Flask (ver Figura 5.1) para los cultivos iniciales de 2 y 10 ml. Asimismo, al escalar a volúmenes de 100 ml se propone el uso de este mismo tipo de botellas (T-Flask), siguiendo el protocolo común de fermentación llevado a cabo en equipos incubadores agitados (shakers) (ver Figura 5.2), sistema conocido comúnmente como shake flask. Las botellas deberían poseer características no tóxicas ni pirogénicas y una tapa modelo con una membrana de 0,2 μm para permitir el intercambio gaseoso (Cole-Parmer, 2013).



Figura 5.1: T-Flask. (Cole-Parmer, 2013)



Figura 5.2: Shaker. (Cole-Parmer, 2013).

Finalmente, para las última etapas de propagación, dado que se trabajaría con volúmenes de 500 ml, 2 y 4 litros, se recomienda el uso de recipientes cerrados que incluyen un sistema agitación autónomo (spinner flask) (ver Figura 5.3). Esto permite proporcionar un flujo en todas las porciones del frasco de cultivo asegurando una circulación homogénea de células y medio tal que la disponibilidad de oxígeno y nutrientes sea la adecuada para el crecimiento celular, pudiendo alcanzar una concentración celular (de células CHO) cercana a $1,85 \cdot 10^6$ [cel/ml] con una agitación de 60 rpm (Abidin & Anuar, 2011). Para los spinner flask escogidos, la agitación puede proveerse por medio de agitadores magnéticos (Cole-Parmer, 2013). Cabe mencionar que se propone utilizar este tipo de recipientes para las etapas finales de propagación, pues permiten un mejor y mayor crecimiento celular frente al cultivo en T-flask (Abidin & Anuar, 2011). Se utilizarán spinner flask con volúmenes útiles de 1, 3 y 6 litros (cercanos al doble de lo que se requiere) para los cultivos mencionados, pues se recomienda llenar aproximadamente hasta el 50% del volumen útil con el fin de proporcionar bastante espacio de cabeza para suplementar el oxígeno requerido (Abidin & Anuar, 2011). Por otro lado, es importante destacar, que se todo el proceso de propagación se realizará en habitaciones temperadas a 35°C y acondicionadas.



Figura 5.3: Spinner Flask. (Cole-Parmer, 2013).

En la Tabla 5.1 se presenta un resumen de los materiales principales seleccionados para la etapa de propagación y algunas características de importancia.

Tabla 5.1: Materiales Propagación.

Material	Capacidad útil	Material	Cantidad
T-Flask 25 ^(a)	7 [ml]	Poliestireno	1
T-Flask 25 ^(a)	10 [ml]	Poliestireno	1
T-Flask 150 ^(a)	175 [ml]	Poliestireno	1
Spinner Flask	1 [l]	VBS*	1
Spinner Flask	3 [l]	VBS*	1
Spinner Flask	6 [l]	VBS*	1
Shaker	6,8 [kg]	-	1
Agitador Magnético ^(b)	15 [l]	Cerámica	1

^(a) El número indica la superficie [cm²] de cada T-Flask.

^(b) Velocidad de agitación de 0 a 1300 rpm y mantención de temperatura de 21 a 540 °C (Cole-Parmer, 2013).

* VBS: Vidrio Borosilicatado

Consumo Energético

El consumo energético para los equipos en la etapa de propagación se resume en la Tabla 5.2, utilizando datos de un catálogo (Cole-Parmer, 2013).

Tabla 5.2: Potencia de equipos en etapa de propagación.

Equipo	Potencia [W]
Shaker	69
Placa Agitación	800

5.2 PRODUCCIÓN

5.2.1 Biorreactor (R-1)

En esta etapa, tal como se ha fundamentado en el Capítulo 3 del presente trabajo, la modalidad de cultivo seleccionada es un cultivo en perfusión, lo que permitiría alcanzar altas densidades celulares aumentando la producción total por lote de proteína recombinante.

Teniendo claro lo anterior y debido a que el producto estudiado en este trabajo corresponde a un biofármaco, es decir, requiere asegurar una esterilidad absoluta, es que se presenta la posibilidad de trabajar con reactores desechables o de uso único (Single-Use: SU), habilitados para trabajar en perfusión. Este tipo de tecnología es relativamente nueva, llevando más de una década de desarrollo presenta una serie de ventajas frente los sistemas convencionales, sobre todo cuando se trata de la industria farmacéutica. Estos biorreactores reemplazan el tradicional recipiente de cultivo fabricado de vidrio o acero inoxidable por una bolsa desechable constituida por distintas capas de plásticos, e incluyen sensores (pH, temperatura, etc.) de plástico desechables o utilizando tecnología de fibra óptica (ver Figura 5.4).

Por otro lado, al tratarse de reactores desechables, no se requiere de sistemas de CIP (cleaning in place) ni SIP (sterilization in place), lo que reduce significativamente la utilización de agua y energía para generar vapor. Además, estas bolsas desechables son entregadas por el proveedor listas para ser instaladas (selladas y esterilizadas), tardando sólo lo que demora la instalación de dicha bolsa para iniciar el cultivo y evitando cualquier tipo de contaminación cruzada atribuible a la manipulación y mantención de un reactor convencional. Es importante destacar que no impide la contaminación al

manipular el medio de cultivo o el inóculo previo a la utilización del sistema SU. Todos estos aspectos resultan en una reducción del tiempo de operación y reducción en los requerimientos de validación del proceso de producción, puesto que se descartan todos los requisitos de CIP y SIP, simplificando en gran medida la producción final del biofármaco.

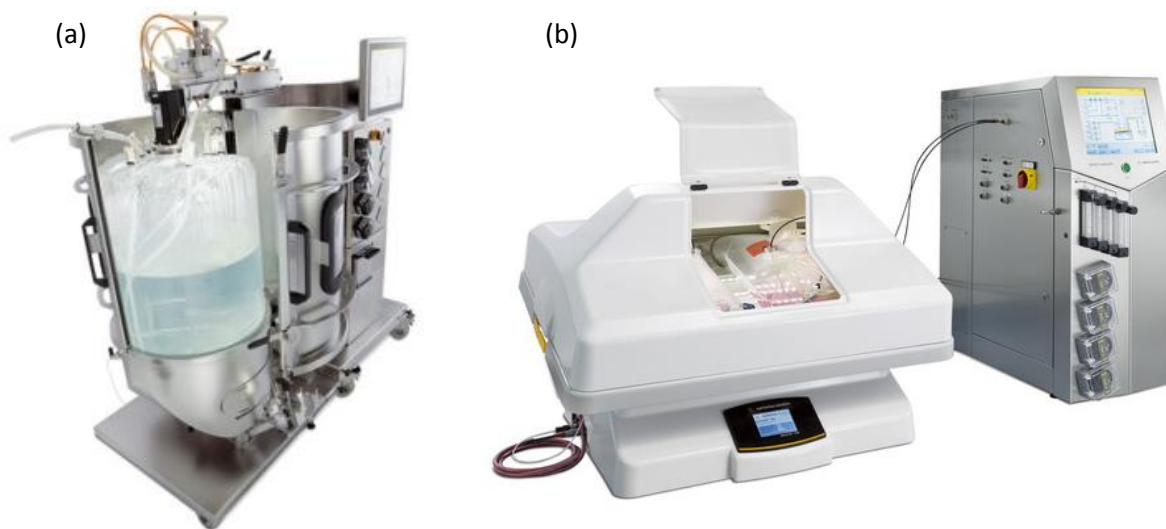


Figura 5.4: Reactores Single-Use. (a) Biostat® STR, consta de una carcasa de acero inoxidable y en su interior contiene la bolsa SU. Se comporta como un reactor STR tradicional. (b) Biostat® RM, reactor de tipo ola (wave) que consiste en una bolsa SU montada sobre una base oscilatoria (rocker) que proporciona la agitación y temperatura necesarias. Ambos reactores fabricados por Sartorius Stedim Biotech. (Sartorius Stedim Biotech, s.f.).

En cuanto a las características operacionales, si bien al principio se presentaban limitaciones en la transferencia de masa ($k_L a$), hoy en día se han obtenido resultados que no distan de los biorreactores STR tradicionales (Adams, Noack, Frick, Greller, & Fenge, 2011).

Por las razones mencionadas y considerando que el presente trabajo se enfoca en la producción de un biofármaco utilizando células CHO, se ha determinado utilizar un sistema Single-Use. Dada la escala de producción (25 litros), se adecua de mejor manera un biorreactor del tipo wave (ver Figura 5.4 (b)) que contempla una base móvil (rocker) que genera un movimiento oscilatorio adecuado para el mezclado, además de regular la temperatura mediante una placa calefactora. Para ello se ha escogido el reactor Biostat® RM 50 en perfusión fabricado por Sartorius Stedim Biotech, siendo lanzado al mercado el año 2011 (Sartorius Stedim Biotech, 2013).

El rocker está conectado a una torre de control equipada con elementos de medición y control además de una pantalla que indica los valores censados (pH, temperatura, agitación) y los regula. Además esta torre de control contiene un sistema de gasificación con respectivas membranas de filtración y un set de bombas peristálticas que permiten la alimentación y recolección de medio hacia y desde el sistema de perfusión respectivamente.

Se utiliza la bolsa se volumen total 50 litros, puesto que el volumen útil máximo es de un 50% del volumen total, para proporcionar un espacio de cabeza adecuado para el suministro gaseoso (Sartorius Stedim Biotech, 2011). Por lo que en este caso se estaría trabajando en el límite máximo de capacidad recomendada de la bolsa, 25 litros.

Por otro lado, las características y puertos de la bolsa Single-Use (ver Figura 5.5) se presentan en la Figura 5.6. Esta bolsa incluye además una membrana de polietilsulfona (PES) con tamaño de poros de 1,2 μm fijada en el fondo de la misma (ver Figura 5.6) (Sartorius Stedim Biotech, 2011); lo que permitiría generar una microfiltración que retenga las células CHO cumpliendo con la modalidad de cultivo en perfusión escogida.

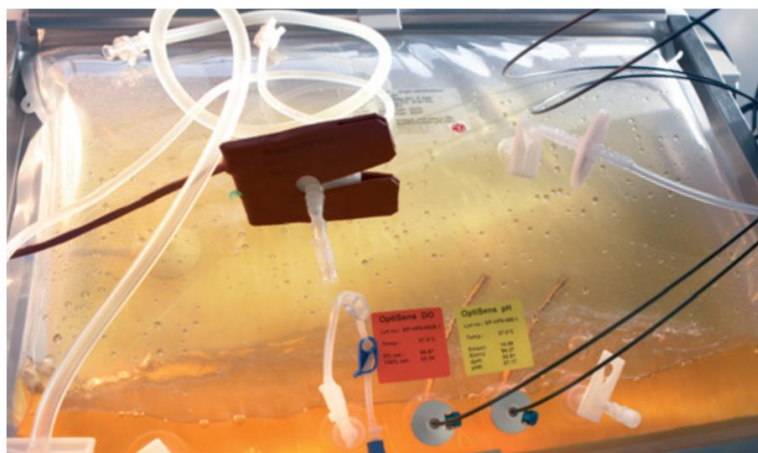
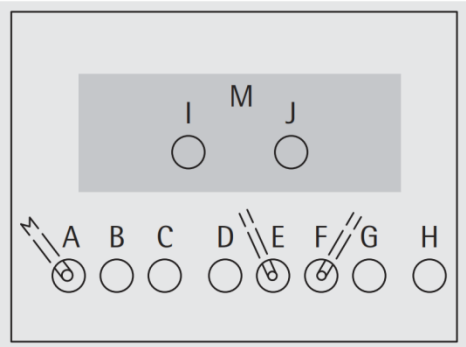


Figura 5.5: Bolsa Single-Use. Cultibag® RM de Sartorius (Sartorius Stedim Biotech, 2011).



A	Tubo de silicona sumergible; C-Flex® 374 1/4" x 7/16" (1000 mm), FM-MPC
B	C-Flex® 374 1/8" x 1/4" (1000 mm), FM-Luer
C	C-Flex® 374 1/8" x 1/4" (1000 mm), PharMed® 1/8" x 1/14" (300 mm), FM-Luer (Alimentación Perfusión)
D	Septo para muestreo, FM-Luer
E	Sensor DO
F	Sensor pH
G	C-Flex® 374 1/8" x 1/4" (1000 mm), PharMed® 1/8" x 1/14" (300 mm), FM-Luer (Cosecha Perfusión)
H	C-Flex® 374 1/4" x 7/16" (1000 mm), M-MPC
I	Filtro para salida de gas con válvula check, M-Luer
J	Filtro para entrada de gas 1/4" Hose barb
M	Membrana de perfusión, PES 1.2 µm, fijada al fondo de la bolsa

Figura 5.6: Esquema de una bolsa Single-Use. Cultibag® RM de Sartorius (Sartorius Stedim Biotech, 2011).

En este sistema se puede utilizar tanto aire comprimido como aire del ambiente (Sartorius Stedim Biotech, 2011), en este caso se utilizará aire atmosférico previamente filtrado a través de un filtro desechable de 0,2 µm incorporado en el sistema, con el fin de entregar la calidad de aire deseada.

Para el caso del sistema escogido, las velocidades de perfusión recomendadas son desde 1 a 3 volúmenes reactor por día¹, por lo que, junto con un análisis de la concentración de biomasa alcanzada través del modelo planteado (ver Capítulo 3), se decide trabajar a una velocidad de dilución (D) igual a 2,5. Este valor se encuentra dentro del rango recomendado y entrega una biomasa suficientemente alta para generar la cantidad de *rhBMP-2* por lote necesaria para cumplir con los requerimientos anuales propuestos.

Dimensiones, Temperatura, Agitación y Bombas

En el caso de las dimensiones y agitación del reactor, al tratarse de una forma completamente distinta a la tradicional, tanto desde el punto de vista estructural como de mezclamiento, y no poseer los conocimientos adecuados, no se puede establecer con exactitud alguna ecuación de diseño. Es por esto que se opta por utilizar los valores recomendados y establecidos por el fabricante para la producción de la proteína.

¹ Comunicación directa con Javier Lobo, Especialista en Aplicaciones de FRT, Sartorius Stedim Biotech.

Respecto a las dimensiones, como ya se ha mencionado, se propone utilizar una bolsa Single-Use de volumen total 50 litros (Cultibag® RM 50) (Figura 5.5), que proporciona un volumen útil de hasta 25 litros, justamente requeridos en este caso. Las características del reactor se pueden observar en la Tabla 5.3.

En cuanto a la potencia de agitación, al tratarse de un movimiento oscilatorio que no requiere paleta, no se cuenta con las ecuaciones y datos pertinentes que permitan determinar de forma realista algún valor de potencia, por lo que se opta por utilizar los datos entregados por el fabricante. Según experiencias realizadas con la línea celular humana Per C6 en la producción de anticuerpos IgG, la agitación se aumenta a medida que incrementa la concentración celular en el reactor; es así como los valores de movimiento oscilatorio (rocks en inglés) varían de 19 a 23 [rocks/min] (Adams *et al* 2011). Asimismo, los ángulos de la base rocker varían de 6° a 10° llevando un aumento en el tamaño de la ola producida, aumentando de esa forma la superficie de intercambio líquido-gaseoso y así la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO u OTR en inglés) (Adams *et al*, 2011). En base a los datos anteriores y considerando que la sensibilidad de operación de la línea celular Per C6, se decide operar bajo las mismas condiciones, asumiendo una respuesta positiva por parte de la línea celular CHO (ver Tabla 5.4).

Por otro lado, para la mantención de la temperatura, la base (rocker) contiene un panel calefactor (ver Figura 5.7) utilizando resistencias eléctricas que permite mantener la temperatura dentro de cierto rango (ver Tabla 5.3) (Sartorius Stedim Biotech, 2011). Este panel a través de un software de control incorporado en el equipo permitiría operar a las temperaturas necesarias en la producción: 37 y 31 °C.

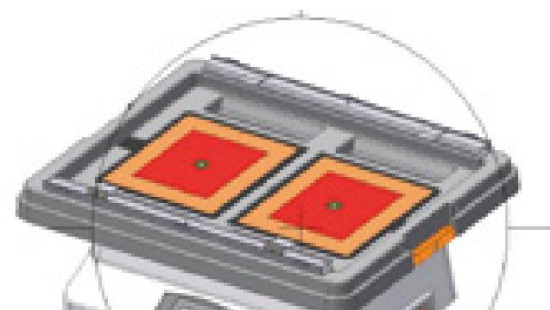


Figura 5.7: Panel calefactor BIostat RM 20|50. (Sartorius Stedim Biotech, 2011).

Tabla 5.3: Principales Características Reactor BIOSTAT RM 50. (Sartorius Stedim Biotech, 2011).

Parámetro	Unidad	Valor
Volumen total bolsa	[l]	50,0
Volumen útil bolsa (mín - máx)	[l]	5,0 a 25,0
Dimensiones Contenedor*	[mm]	1085 x 600 x 255
Dimensiones Torre Control*	[mm]	320 x 735 x 565
Control de temperatura (mín - máx)	[°C]	15,0 - 40,0
Oscilación de rocker (mín - máx)	[rocks/min]	8,0 - 42,0
Ángulo de rocker (mín - máx)	[°]	4,0 - 10,0

* W x H x D: Ancho x Alto x Profundidad

Aireación

Asumiendo que la mayoría de las unidades y medidas operacionales son equivalentes a las de un biorreactor tradicional STR, se establecen los parámetros operacionales de aireación en base a los cálculos tradicionales de requerimiento de oxígeno.

Dado un balance de masa se puede establecer la variación de la concentración de oxígeno (C_L) como la resta entre la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la velocidad de consumo del mismo (VCO):

$$\frac{dC_L}{dt} = VTO - VCO \quad (Ec. 24)$$

Con:

$$VTO = k_L a \cdot (C^* - C_L) \quad (Ec. 25)$$

$$VCO = q_{O_2} \cdot X_t \quad (Ec. 26)$$

Donde:

$k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}]

C_L : Concentración de oxígeno disuelto en el medio [mg/mL]

C^* : Concentración de oxígeno al equilibrio [mg/mL]

q_{O_2} : Velocidad específica de consumo de oxígeno [mg O₂/mg cél/h]

X_t : Concentración de biomasa [mg/ml]

Para suplir la cantidad necesaria de oxígeno al medio, se asume que la VCO es igual a la VTO, por lo que el requerimiento de oxígeno (N_a) queda determinado así:

$$N_a = k_L a \cdot (C^* - C_L) = q_{O_2} \cdot X_t \quad (Ec. 27)$$

Para determinar la demanda de oxígeno, se cuenta con los datos de concentración de biomasa obtenidos mediante el modelo planteado en el Capítulo 3 y una velocidad específica de consumo de oxígeno estándar según datos bibliográficos de $2,9 \cdot 10^{-10}$ [mmol O₂/cel/h] (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013)

En cuanto a la cantidad de biomasa, no existe mucha variación entre la concentración a 37 °C de 3,36 [mg/ml] (día 8 del cultivo en perfusión) y de 3,38 [mg/ml] una vez alcanzado el estado estacionario a 31°C (día 10 del cultivo en perfusión); luego, realizando un cambio de unidades en el que se considera el peso seco de biomasa de 0,315 [mg/10⁶ cél], se obtiene una concentración de biomasa de $1,067 \cdot 10^7$ [cél/ml] a 37 °C y de $1,072 \cdot 10^7$ [cél/ml] a 31 °C. Se observa entonces que no existe una diferencia significativa en ambos valores. Luego, se procede a reemplazar estos valores en la Ec. 27 para determinar el requerimiento de oxígeno, como se muestra a continuación:

$$N_a = 2,9 \cdot 10^{-10} \left[\frac{mmol O_2}{cel \cdot h} \right] \cdot 1,067 \cdot 10^7 \left[\frac{cel}{ml} \right] \cdot 1000 \left[\frac{ml}{l} \right] = 3,10 \left[\frac{mmol}{l \cdot h} \right]$$

Se realiza el mismo cálculo utilizando los datos a 31 °C, corroborándose que no existe una diferencia significativa como se puede observar en la Tabla 5.4.

La tasa específica de flujo de aire al reactor medida en volumen de gas por volumen de líquido por minuto (vvm) puede definirse como:

$$\frac{F}{V} = \frac{Na \cdot 22,4 \cdot T}{1000 \cdot 0,21 \cdot E \cdot P \cdot 273 \cdot 60} \quad (Ec. 28)$$

Donde:

F/V: Tasa específica de aireación [vvm]

E: Tasa de absorción

Na: Requerimiento de aire [mol O₂/l/h]

P: Presión [atm]

T: Temperatura [K]

Así, estableciendo una presión de 1 [atm] y tasa de absorción del 3%, considerando el peor de los casos entre un rango de 3 a 30% (Acevedo, 2002), se calcula el flujo de aire por volumen de líquido requerido.

Reemplazando los valores para 37 °C se obtiene:

$$\frac{F}{V} = \frac{3,10 \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{h}} \right] \cdot 22,4 \cdot (37 + 273,15)}{1000 \cdot 0,21 \cdot 0,03 \cdot 1 \cdot 273 \cdot 60} = 0,208 \text{ [vvm]}$$

Finalmente se resumen los resultados para ambas temperaturas en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Requerimientos para aireación.

Parámetro	Unidad	37 [°C]	31 [°C]
Na	[mmolO ₂ /L/h]	3,10	3,11
vvm	[ml/ml/min]	0,208	0,205

Como ya se ha mencionado, los valores no difieren significativamente entre la fase transiente a 37 °C y el estado de hipotermia suave, por lo que se puede asumir un valor común para todo el cultivo en perfusión. Los valores de agitación u oscilaciones del rocker, ángulo de rocker y aireación (vvm) definidos para la operación a 37 y 31 °C se pueden observar en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5: Condiciones de operación del biorreactor.

Parámetro	Temperatura de operación	
	37 °C	31 °C
Oscilación de rocker [rocks/min]	19	23
Ángulo de rocker [°]	7	10
Aireación (vvm)	0,2	0,2

Consumo Energético

En cuanto al balance de energía, sobre el calor de fermentación se tiene que los datos obtenidos para fermentaciones aerobias según la ecuación Ec. 28 (Acevedo, 2002) (ver Tabla 5.4) son despreciables frente al consumo energético del reactor (ver Tabla 5.6).

$$Q_F = 0,12 \cdot VCO \quad (\text{Ec. 29})$$

Tabla 5.6: Calor de fermentación.

Calor de Fermentación (Q_F)	Temperatura de operación	
	37 °C	31 °C
[kcal/h]	7,584	9,768
[W]	9	11

Por otro lado, como se menciona anteriormente al tratarse de un tipo de reactor distinto a los convencionales en cuanto a geometría, material y operación, las ecuaciones tradicionales para determinar los calores de agitación y control de temperatura puede que sean diferentes. Es por esa razón que se opta por considerar que los datos de consumo energético del reactor entregados por el fabricante, los que ya contemplarían un gasto por control de temperatura y agitación de forma

conjunta, pues se trata de una única unidad (torre de control) que regula todos los parámetros mencionados.

Además, el sistema lleva incorporado 2 bombas peristálticas al interior de la torre de control y otras 2 bombas externas que permiten una alimentación y cosecha de medio completamente automatizada y controlada por medio de controladores de flujo gravimétricos que aseguran velocidad de flujo adecuadas (Sartorius Stedim Biotech, 2011). Cada bomba puede proporcionar una velocidad de perfusión de 2 a 55 [l/d] (Sartorius Stedim Biotech, 2011), por lo que si se cuenta con las bombas adicionales externas, se alcanza una tasa de perfusión deseada de 62,5 [l/d]. Sin embargo, no se cuenta con el consumo energético estimado de cada una de estas bombas, por lo que se consideró el consumo de una bomba de la misma marca (Sartorius Stedim) modelo Microsart Mini que proporciona un caudal máximo de 6 [l/min] (Sartorius, s.f.), sobreestimando de esta manera el consumo.

Entonces, considerando que el calor generado por la fermentación es bajo, se asume que los valores de consumo energético (por control de temperatura) pueden corresponder a este tipo de fermentación; y adicionando el gasto por agitación y bombeo, el consumo energético total estimado para el biorreactor BIOSTAT™ RM 50 se reduce al expuesto en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7: Consumo energético estimado para biorreactor.

Aplicación	Potencia [W]
Calefacción y Enfriamiento	1000
Bomba ^(a)	65
Torre de Control	3680
Rocker	1449
Total Biorreactor	2709

^(a) Valor correspondiente a una bomba.
El sistema completo cuenta con 4.

5.2.2 Estanques de preparación de medio de cultivo (E-3 y E-4)

Según lo calculado en el Capítulo 4 se requerirían 62,5 litros de medio diarios y se diseñará para cumplir con el requerimiento de medio para 4 días (250 [l]) por lo que para su preparación se decide

utilizar 2 estanques de acero inoxidable que funcionen alternados para asegurar la continua alimentación de medio de cultivo en caso de cualquier falla y evitar la pérdida de algún lote (ver Figura 5.8). Así cada estanque deberá preparar 125[l], para ello se recomienda utilizar estanques de mezclamiento con capacidad para el doble de volumen final de medio asegurando un mezclado adecuado (Oxoid Limited, 2013). Sin embargo se piensa que lo anterior puede resultar un poco excesivo por lo que se diseñarán ambos estanques con un factor de seguridad del 60% lo que significa un volumen útil de 200 [l] (ver Figura 5.8) según las relaciones recomendadas presentadas en la Tabla 5.8.

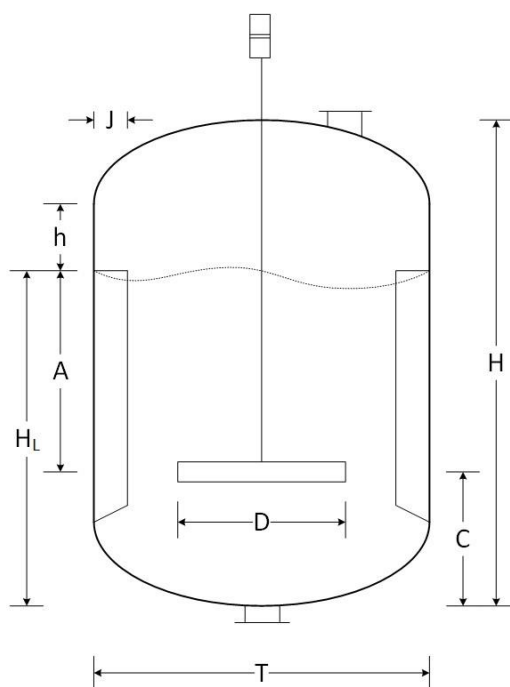


Figura 5.8: Esquema diseño de mezcladores.

Tabla 5.8: Relaciones recomendadas.
(Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013) (Acevedo, 2002) (Couper, Penney, Fair, & Walas, 2012).

Parámetro	Valor
h/H_L	0,2
H_L/T	1
J/T	0,1
C/T	0,33
A/D	1,15
D/T	0,33

La geometría corresponde a un tanque cilíndrico con tope y fondo semiesférico, este último recomendado para evitar la acumulación de cualquier sólido en las esquinas y aumentar la calidad de suspensión (Hemrajani & Tatterson, 2003). Respecto al tipo de impulsor (impeller), se busca generar un flujo axial, recomendado para operaciones de mezclado, por lo que se utilizará una turbina de paletas inclinadas 45° (Pitched-blade turbine –PBT– 45°) de 6 paletas (ver Figura 5.8) adecuado para el mezclado considerando un fluido con las características del agua (Hemrajani & Tatterson, 2003). Dada una relación H_L/T igual a 1 (ver Tabla 5.8) no es necesario considerar múltiples impulsores (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013) (Brawn Mixer, Inc. , 2003). Por otra parte, se consideran 4 deflectores (baffles) para asistir el mezclado y generar mayor turbulencia.

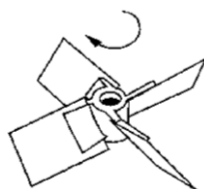


Figura 5.9: Turbina de paletas inclinadas (Pitched-blade Turbine).

De esa forma y considerando un volumen de 200 litros y la ecuación Ec. 30, se obtiene el diámetro (T) del estanque presentado en la Tabla 5.9.

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{cilindro}} + V_{\text{semiesfera}} = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot T + \frac{1}{3} \cdot \pi \cdot \frac{T^3}{4} \quad (\text{Ec. 30})$$

Luego, con el valor obtenido y el resto de las relaciones se determinan las dimensiones del estanque de mezcla, presentados en la Tabla 5.9. Para determinar la altura del mezclador (H) se consideró la altura de líquido (H_L), la altura h y el radio de la semicircunferencia de diámetro T .

Tabla 5.9: Dimensiones de E-3 y E-4.

Característica	Valor
T [cm]	58
H_L [cm]	58
J [cm]	6
D [cm]	19
A [cm]	22
C [cm]	19
H [cm]	98
Número de Impulsores	1
Número de Deflectores	4
Cantidad de Estanques ^(a)	2

^(a) Un estanque por línea de preparación de medio.

Agitación y consumo energético

La potencia de agitación para un impulsor está definida por la ecuación Ec. 31.

$$P = \frac{N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5}{g_c} \quad (\text{Ec. 31})$$

Donde,

P: Potencia [W]

N: velocidad de agitación [rps]

ρ : Densidad del fluido; 1000 [kg/m³]

D: Diámetro del impulsor [m]

N_p : Número de potencia del impulsor

g_c : Factor de conversión igual a 1 [kg·m/N·s²]

Luego, para conocer el número de potencia, se requiere conocer el régimen de flujo bajo el cual se trabaja, determinado por el número de Reynolds (Re) (Ec. 32), la velocidad de agitación y el tipo de impulsor.

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu} \quad (Ec. 32)$$

Donde,

Re : Número de Reynolds

μ : Viscosidad dinámica de solución; 0,001 [kg/m·s]

Buscando la velocidad de agitación (N) tal que el régimen sea turbulento ($Re > 10^4$), utilizando un valor de Re igual a 10^4 , se obtiene una velocidad de 0,44 [rps]. Por lo que dadas las características del sistema incluso a una muy baja velocidad de agitación ya se obtiene un perfil turbulento, permitiendo mayor flexibilidad para la elección de una velocidad de agitación. Finalmente se opta por utilizar un velocidad de agitación de 400 rpm lo que entrega un Re de $2,41 \cdot 10^5$.

Conociendo Re , mediante el gráfico que relaciona Re y N_p (ver línea 2 para PBT en Apéndice C.1) se obtiene el valor del número de potencia del impulsor. Por otro lado, se diseña para trabajar bajo régimen turbulento y a altos valores de Reynolds el número de potencia se hace constante (como se puede observar en dicho gráfico, Apéndice C.1), por lo que se decide utilizar un valor típico para impulsores PBT 45° en un sistema de 4 deflectores de 1,64 (ver Apéndice C.2). Con esos valores se puede determinar el valor de la potencia según la ecuación inicial (Ec. 31).

$$P = \frac{1,64 \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \left(6,67 \left[\frac{1}{s} \right] \right)^3 \cdot (0,19[m])^5}{1 \left[\frac{kg \cdot m}{N \cdot s^2} \right]} = 120,5 [W]$$

No es necesario realizar algún tipo de corrección a la potencia obtenida ya que se cumple que con las relaciones geométricas adecuadas para asumir el valor de N_p según lo presentado en el Apéndice C.2 antes mencionado.

Luego la potencia total del sistema según lo descrito en la ecuación Ec. 33 queda en función de la cantidad de impulsores (n) y la eficiencia del motor (η), para este caso $n = 1$ y se asume una eficiencia del 60%, por lo que la potencia final se presenta en la tabla resumen Tabla 5.10.

$$P_T = \frac{P \cdot n}{\eta} \quad (\text{Ec. 33})$$

Adicionalmente se determina un tiempo estimado de mezclado según la ecuación Ec.34, expresado en función de variables conocidas (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013).

$$t_m = \frac{5,4}{N} \cdot \left(\frac{1}{N_p} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot \left(\frac{T}{D} \right)^2 \quad (\text{Ec. 34})$$

$$t_m = \frac{5,4}{6,67 \left[\frac{1}{s} \right]} \cdot \left(\frac{1}{1,64} \right)^{1/3} \cdot \left(\frac{1}{0,33} \right)^2 = 6,3[s]$$

De acuerdo a lo anterior, el mezclado a 400 [rpm] debiera llevarse a cabo a los 6,3 [s], de esta forma y para asegurar la disolución del medio, se define un tiempo de mezclado mínimo de 1 minuto antes de comenzar a transportar el medio hacia el microfiltro de esterilización.

Tabla 5.10: Condiciones de agitación y potencia para un estanque.

Parámetro	Símbolo	Valor
Número de Reynolds	Re	$2,41 \cdot 10^5$
Velocidad de agitación	N	400 [rpm]
Número de Potencia	N_p	1,64
Potencia Total	P_T	200,75 [W]
Tiempo de mezclado mínimo*	t	1 [min]

*El tiempo de mezclado es el mínimo para comenzar a esterilizar

Es importante mencionar que puesto que la esterilización del medio se realizará por medio de un microfiltro posterior al mezclado y que se preparará el medio de cultivo utilizando agua ultra purificada Tipo I, estos estanques de mezclado no serán esterilizados sino desinfectados con agentes químicos (alcoholes, agentes oxidantes, etc.). De esta forma se permitirá un mayor ahorro de agua y energía para generar vapor de esterilización.

5.2.3 Esterilización de medio de cultivo (M-1 y M-2)

Debido a que el medio de cultivo contiene componentes termosensibles como por ejemplo vitaminas, la esterilización se llevará a cabo a través de un proceso de microfiltración. Para ello las membranas utilizadas típicamente son fabricadas de ésteres de celulosa u otros polímeros y tienen tamaños de poro entre 0,22 y 0,45 μm (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013). Sin embargo, las membranas de 0,2 μm no retienen micoplasmas y virus, por lo que el uso de membranas de 0,1 μm que si proporcionen un grado de esterilidad pudiendo retener hasta micoplasmas se ha extendido bastante, sobre todo procesos que involucren cultivos de células mamíferas (Doran, Bioprocess Engineering Principles, 2013).

Luego, de acuerdo a lo mencionado se decide utilizar una cápsula de filtración con una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofílico y de 0,1 μm , modelo Durapore® Opticap® XL marca Millipore (ver Figura 5.9) destinada a filtración de líquidos de la industria biofarmacéutica (Merck Millipore, 2012). Para determinar el largo del filtro, se recomienda el uso de una cápsula más pequeña², por lo que se decide realizar los cálculos con la cápsula XL 2. En la tabla Tabla 5.11 se presentan algunas características principales de la cápsula de filtración, para mayor información acerca de la membrana ver Apéndice C.3.

Tabla 5.11: Características Opticap® XL 2. (Merck Millipore, 2012)

Parámetro	Dato
Membrana	PVDF Hidrofílico
Largo máximo [cm]	14,2
Diámetro [cm]	8,4
Área de filtración [m^2]	0,09
Diámetro de manguera (entrada y salida) [in]	0,25

² Comunicación directa con representante de Merck Chile.



Figura 5.10: Cápsula de filtración Opticap® XL y soporte.

Luego, para conocer el flujo adecuado para la cápsula, se fija una caída de presión de 0,2 [bar] recomendada³ y según las pruebas realizadas por el fabricante (ver Figura C.3 en Apéndice C.3) se obtiene un flujo de 0,7 [l/min]. Así, considerando que se desean esterilizar 125 [l], el tiempo de esterilización por membrana debiera ser de aproximadamente 3 [h]. En la Tabla 5.12 se presentan las principales condiciones de operación de la cápsula de filtrado.

Tabla 5.12: Parámetros de operación de la filtración.

Parámetro	Valor
Cantidad de cápsulas ^(a)	2
Caída de presión [bar]	0,2
Caudal [l/min]	0,7
Tiempo total de filtrado [h] ^(b)	3

^(a) Una cápsula por línea de preparación de medio

^(b) Tiempo considerado para filtrar 125 litros

³ Comunicación directa con representante de Merck Chile.

Tal como en el caso de los estanques de preparación de medio de cultivo en los que se consideran 2 líneas, los sistemas de filtrado para esterilizar el medio también están considerados en ambas líneas como se puede ver en el diagrama de flujo (Figura 5.19).

5.2.4 Estanques de almacenamiento de medio de cultivo y producto (E-5, E-6 y E-7)

Según lo mostrado en el diagrama de flujo (ver Figura 5.19), se presentan dos estanques de almacenamiento de medio cultivo previo al ingreso al reactor de volumen 50 [l] y uno posterior al filtrado de 100 [l]. Para continuar con la misma línea que asegure esterilidad y simplifique los procesos de validación, y considerando que la preparación y el transporte de medio de cultivo puede ser un foco de contaminación, se decide que estos estanques sean del tipo Single-Use Flexel® (ver Figura 5.11), correspondiente a la misma línea del reactor escogido (ver subsección 5.2.1). De esta manera, al ya haber esterilizado el medio se puede asegurar de mejor manera la inexistencia de contaminantes permitiendo comenzar desde ese punto con una línea que esté a la altura de los requerimientos de la industria farmacéutica.

En el caso específico de las bolsas Flexel SU para el medio (E-5 y E-6), se considera la adición de un sistema de agitación que incorpora paleta single-use que permita mantener homogenizado el medio de cultivo evitando la posible precipitación de sales u otros componentes. Se descarta la preparación del medio en dichas bolsas, ya que la preparación se realiza de forma diaria, aumentando la renovación de estas bolsas y porque de todas formas requiere de una esterilización posterior; por lo que tener un sistema desechable, utilizado principalmente por sus beneficios de esterilidad, previo a dicha esterilización sería un costo adicional innecesario.

Por otro lado, la recepción de medio perfundido proveniente del biorreactor sería acumulado en una bolsa SU de similares características (E-7). Estas bolsas cuentan con un soporte Palletank® (ver Figura 5.11) que permite la conexión las mangueras y mejor manipulación de la bolsa.

Las bolsas SU, tanto de almacenamiento de medio como de producto, serían reemplazadas por nuevas una vez terminado el lote de, siguiendo el mismo procedimiento que con el biorreactor.



Figura 5.11: Bolsa SU Flexel® sin paleta agitadora y Palletank® de Sartorius Stedim.

Consumo Energético

No se tiene el valor exacto de consumo por agitación de este sistema, sin embargo un sistema análogo de agitación es el LevMix (de la misma línea Single-Use de Sartorius) (Sartorius Stedim). Este equipo permite una agitación de hasta 180 rpm para estanques de volúmenes entre 50 y 560 [l] con una potencia máxima de 350 [W]; entonces si se asume que funcionará a 90 [rpm] para mantener una pequeña agitación del medio, se puede estimar un consumo de máximo de 300 [W] (realizando una sobre estimación del mismo).

5.3 RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN

Los cálculos realizados para el diseño de los equipos involucrados en la etapa de recuperación y purificación están basados en los datos entregados como referencia en la patente US 2013/0060012 A1 para la purificación de BMP mencionada en los capítulos anteriores (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013) (Ver patente en Apéndice E). En términos operacionales, se decide realizar

diariamente el proceso de purificación para la cantidad de líquido acumulado hasta el minuto, que dada la tasa de perfusión escogida correspondería a 62,5 litros diarios. De esta manera se estabiliza el producto lo más pronto posible evitando largos tiempos de almacenamiento en solución dada la corta vida media de la proteína en solución.

Por otro lado, se dividirá esta sub-sección en diseño de filtraciones y cromatografías lo que no corresponde necesariamente al orden de las operaciones en el proceso, para facilitar la comprensión según las decisiones tomadas y las ecuaciones a utilizar.

5.3.1 Filtraciones: Ultrafiltración (UF) y Diafiltración (DF)

Ultrafiltración (UF-1)

Para comenzar el proceso de separación y como pre-tratamiento del medio de cultivo, se utilizará para esta etapa una membrana de polietersulfona y que presenta un peso de corte de 30 kDa, indicado en la patente antes mencionada. Esto permitiría retener la *rhBMP-2* y reducir el volumen hasta 10 veces (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Considerando las distintas modalidades y tecnologías disponibles, se opta por utilizar dispositivos tipo cassette, ya que se trata de una de las modalidades UF más escalables y con mejores eficiencias de transferencia de masa, frente a la fibra hueca y espiral (Shukla & Yigzaw, 2007). Para ello se decide utilizar el modelo Pellicon® 2 Serie Biomax 30 marca Millipore con su respectivo soporte (ver Figura 5.12).

A partir de la definición de flux, se puede determinar el área de filtración necesaria según la ecuación Ec. 35 una vez conocidos flux, volumen inicial y final, y el tiempo destinado a la ultrafiltración.

$$A = \frac{1}{J} \cdot \frac{(V_o - V)}{\Delta t} \quad (Ec. 35)$$

Donde,

A: Área de filtración [m²]

V: Volumen final [l]

J: Flux [l/m²·h]

t: Tiempo [h]

Vo: Volumen inicial [l]



Figura 5.12: Equipos Pellicon. (Izq.) Cassettes Pellicon® 2 (Der.) Soporte (holder) para cassttes Pellicon.

Por otro lado, para conocer un valor aproximado de flux, se utilizan datos proporcionados por Millipore para este tipo de cassettes utilizando distintas soluciones de BSA (ver Figura C.4a en Apéndice C.4). De acuerdo a los datos definidos en el Capítulo 4, la cantidad de proteína acumulada en un día correspondería a aproximadamente 8,6 [mg], lo que en 62,5 litros de medio acumulado (suponiendo una densidad igual a la de agua) entregaría un 0,0001% p/p de *rhBMP-2* en solución. Así, dada la baja concentración de proteína y comparando ese dato con lo presentado en gráfico mencionado (Figura C.4a Apéndice C.4) se puede estimar un flux de 100 [l/m²·h].

Luego, sabiendo que el volumen inicial corresponde a 62,5 [l] y que al reducirse 10 veces se obtiene un volumen final de 6,25 [l] y diseñando para realizar la operación de filtrado en un tiempo de 15 [min] (0,25 [h]) se procede a reemplazar todos los valores en la Ec. 35. De esa forma se obtiene que el área requerida es de 2,25 [m²]; así, el módulo cassette escogido es de 2,5 [m²] presente en el mercado y de características descritas en la Tabla 5.13 (de acuerdo a la ecuación inicial Ec. 35, en base al nuevo área de filtrado el tiempo fue recalculado).

Así, a modo de ejemplo de cálculo se tiene:

$$A = \frac{1}{100 \text{ [l/m}^2 \cdot \text{h]}} \cdot \frac{\left(62,5 - \frac{62,5}{10}\right) \text{ [l]}}{15 \text{ [min]}} \cdot 60 \left[\frac{\text{min}}{\text{h}}\right] = 2,5 \text{ [m}^2\text{]}$$

Luego, lo recalculado según lo disponible en el mercado es:

$$t = \frac{1}{100 [l/m^2 \cdot h]} \cdot \frac{\left(62,5 - \frac{62,5}{10}\right) [l]}{2,5 [m^2]} \cdot 60 \left[\frac{min}{h}\right] = 13,5 [min]$$

Tabla 5.13: Características módulo de ultrafiltración. (Millipore, 2004).

Característica	Descripción
Módulo *	Cassette
Modelo *	Pellicon 2 Serie Biomax 30
Membrana *	Polietersulfona Modificada
Área de filtración *	2,5 [m ²]
Cantidad de módulos	1
Tiempo	13,5 [min]

* Datos obtenidos de (Millipore, 2004)

Por otro lado, el equipo de filtración Pellicon® incorpora una bomba peristáltica que permitiría entregar el flujo adecuado al filtro y según el diagrama de flujo (Figura 5.19) se compraría una adicional, contemplando de esa forma una bomba “spare” en caso de falla.

Diafiltración (UF-2)

La diafiltración se utiliza en este caso para realizar un cambio de tampón (buffer exchange), que se refiere al reemplazo de un set de sales de buffer por otro, para ubicar al producto de interés en un buffer de carga óptimo para una alta selectividad (Lutz & Raghunath, 2007). La UF y la DF son unas de las formas de filtración tangencial que más se utilizan para el cambio de buffer, desalting o la concentración de proteínas (Russell, Wang, & Rathore, 2007). Específicamente para este proceso, la diafiltración se realiza para reemplazar el isopropanol contenido en el tampón utilizado en la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) por L-arginina y glicerol; para lo que se recomienda el uso de una membrana con tamaño de corte 30 kDa y condiciones de operación presentadas en la Tabla 5.14 (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013). Por otra parte, se decide que la operación de diafiltración se llevará a cabo en ciclos de concentración y dilución, en la que los ciclos de concentración se efectúan operacionalmente como una ultrafiltración. Así, considerando estos datos se decide utilizar el mismo tipo de cassette y equipamiento escogido para la UF, cassettes

Pellicon® 2, su respectivo soporte y bomba peristáltica. Sin embargo, es necesario determinar el área de filtración requerida para llevar a cabo la operación, pues puede no resultar ser la misma que en el caso de UF.

Por otro lado, se conocen las condiciones de flujo de entrada (V_o) proveniente de la HIC, ya que corresponde al mismo volumen obtenido luego de la filtración de 6,25 [l], dato que se puede corroborar más adelante en el diseño de la columna HIC (Subsección 5.2.3) y en la Tabla 5.23. Además, por datos presentados en un ejemplo de la patente en el que un volumen inicial de 3 [l] es llevado a un volumen final de 20 [ml] a través de este tipo de diafiltración (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), se puede determinar el volumen final (V_c) en la diafiltración. De acuerdo a lo anterior, se decide mantener la razón entre los volúmenes de entrada y salida de la diafiltración, por lo que para tratar un volumen de 6,25 [l] se obtendría un volumen final aproximado de 41,67 [ml] según la ecuación Ec. 36.

$$V_c = \frac{6,25 [l] \cdot 20 [ml]}{3 [l]} = 41,67 [ml] \quad (Ec. 36)$$

Tabla 5.14: Parámetros operacionales de diafiltración. (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Parámetro	Rango Deseado
Velocidad de bombeo de alimentación	20 [ml/min]
Presión de alimentación	0,8 - 1,2 psi
Presión de retenido	0,1 - 0,2 psi
Presión de permeado	0,1 - 0,2 psi
Presión transmembrana (TMP)	0,4 - 0,6 psi

Por otro lado, considerando una composición de isopropanol ente 10 y 15% p/p en el tampón utilizado en HIC (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), y las propiedades presentadas en la Tabla 5.15, se puede determinar la concentración de isopropanol (C_o) al inicio de la diafiltración.

Tabla 5.15: Características de isopropanol.

Masa Molar [g/mol]	60,1
Densidad [g/ml]	0,786

Para poder conocer la concentración de isopropanol en el tampón utilizado en la elución se debe establecer una densidad promedio (ρ) de éste, considerando una composición de 12,5% de isopropanol y resto agua, lo que resulta en un valor de 0,967 [g/ml].

Entonces, la concentración de isopropanol al 12,5% p/p en el tampón (C_o) es:

$$C_o = 0,125 \cdot 0,967 \left[\frac{g}{ml} \right] \cdot \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 120885,89 \left[\frac{mg}{l} \right]$$

Para efectos de diseño, se opta por efectuar los cálculos considerando que la mayor cantidad de isopropanol será retirada, teniendo un coeficiente de retención para este compuesto (R_i) tendiente a cero, definiéndose así una concentración final (C_n) de 0,001 [mg/L]. En la Tabla 5.16 se resumen los datos iniciales y finales deseados y en los que se basará el diseño.

Tabla 5.16: Diafiltración.

Parámetro	Valor
Volumen inicial (V_o)	6,25 [l]
Voluen final (V_c)	0,04167 [l]
Concentración inicial (C_o)	120885,88 [mg/l]
Concentración final (C_n)	0,001 [mg/l]

* Las concentraciones corresponden a isopropanol

Proponiendo un caso pesimista donde la retención de isopropanol es de 5% ($R_i = 0,05$), se calcula el número de etapas (n) (concentración-dilución) necesarias para alcanzar una concentración final C_n según la Ec. 37 y aproximando al número entero superior.

$$C_n = C_o \cdot \left(\frac{V_c}{V_o} \right)^{n \cdot (1-R_i)} \quad (Ec. 37)$$

$$n = \frac{1}{1 - 0,05} \cdot \frac{\log\left(\frac{0,001}{120885,88}\right)}{\log\left(\frac{0,04167}{6,25}\right)} = 3,88 \approx 4[\text{etapas}]$$

Luego, se recalcula la concentración final (C_n) para conocer el verdadero valor al utilizar 4 etapas de concentrado-diluido (según Ec. 37).

$$C_n = 120885,88 \cdot \left(\frac{0,04167}{6,25}\right)^{4 \cdot (1-0,05)} = 0,00056 \left[\frac{mg}{l}\right]$$

Además, el volumen de eluente utilizado (V_e) correspondería a (Ec. 38):

$$V_e = (V_o - V_c) \cdot (n - 1) \quad (\text{Ec. 38})$$

$$V_e = (6,25 - 0,04167) \cdot (4 - 1) = 18,63 [l]$$

Para determinar el área de membrana requerido, se decide seleccionar de acuerdo a los cassettes Pellicon® 2 disponibles y en función del tiempo que demore realizar los 4 ciclos. Conociendo los datos de presión de la patente (ver Tabla 5.12) y de acuerdo a un gráfico presentado por Millipore para los cassettes Pellicon® 2 (ver Figura C.4b Apéndice C.4), se utilizará un flux de 0,2 [l/m²·min] y un diferencial de volumen ($V_o - V_c$) de 6,21[l] luego los tiempos de duración para cada área de membrana disponible son presentados en la Tabla 5.17 y calculados según la ecuación Ec. 35.

Tabla 5.17: Tiempo de diafiltración según el área de cassette.

Área [m ²]	Tiempo por etapa [min]	Tiempo total	
		[min]	[h]
0,1	310,5	1242	20,7
0,5	62,1	248,4	4,14
2,5	12,42	49,68	0,828

De esta manera, según los datos de tiempo obtenidos, se opta por utilizar el mismo cassette Pellicon® 2 de área 2,5 [m²] para realizar la diafiltración; considerando entonces el mismo soporte (ver Figura 5.12) y bomba peristáltica incluida.

5.3.2 Cromatografías: Exclusión Molecular (SEC) y Interacción Hidrofóbica (HIC)

Cromatografía de Exclusión Molecular (C-2)

Tal como se ha mencionado, se empleará la Teoría Combinada para calcular las dimensiones de la columna. En la Tabla 5.18 se presentan los datos proporcionados por la patente y considerados en este diseño.

Tabla 5.18: Parámetros operacionales de SEC. (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Etapas	Parámetro	Rango Deseado
Todas las Etapas	Presión	≤ 15 psi
	pH	7,0 ± 0,2
	Velocidad de flujo	10 - 30 [cm/h]
Etapas Equilibrado	Volumen	1 CV
	Conductividad	65 - 66 [mS/cm]
Etapas Elución	Volumen	1 CV
	Conductividad	65 - 66 [mS/cm]

Ya que en este tipo de cromatografías el soluto no se une a la columna, los volúmenes de carga son bastante restringidos, por lo general bajo el 5% de CV (Shukla & Yigzaw, 2007). En este caso, el procedimiento de la patente recomienda la utilización de Sephacryl S-100 con una carga del 4% de CV (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013). Para ello se escoge un gel Sephacryl S-100 HR (High Resolution) de GE Healthcare® (antes Amersham®) (Amersham Biosciences, 2002) que corresponde a un medio preparado por uniones de alilos de dextrano con N,N'-metilenbisacrilamida cuya porosidad se encuentra determinada por la composición de dextranos; permitiendo al gel S-100, en este caso, separar moléculas cuyos pesos se encuentran en un rango de 1 a 100 kDa (Amersham Biosciences, 2002).

Con los datos antes mencionados, y considerando que el volumen de la muestra (40 ml) corresponde al 4% del volumen total de la columna, se tiene que el volumen total es: 1041,75 [ml]

Por medio de la Teoría Platos se puede determinar el número teórico de platos de la cromatografía (N) según la Ec. 8 en Apéndice C.5. Sin embargo, la relación entre los volúmenes no podría ser estimada sin previos conocimientos experimentales, por lo que se opta por asumir que V y Vo son iguales, lo que significaría que el volumen de elución corresponde exactamente al volumen para alcanzar el peak del perfil cromatográfico. De esta manera, la expresión de la exponencial de la Ec.8 del Apéndice C.5 sería nula reduciendo la expresión a la expresada en la ecuación Ec. 39, lo que facilita el cálculo del número de platos. Este procedimiento también es tomado por un ejemplo en bibliografía, por lo que no se considera completamente errado (Belter, Cussler, & Hu, 1988).

$$y = \frac{y_A}{\sqrt{2\pi \cdot N}} \quad (Ec. 39)$$

Reemplazando los valores según el balance masa en Ec. 39 se puede despejar que el número de platos es:

$$N = \left(\frac{y_A}{y}\right)^2 \cdot \frac{1}{2\pi} = \left(\frac{0,0929}{0,0035}\right)^2 \cdot \frac{1}{2\pi} = 110,0$$

Por otro lado, según la teoría cinética, para poder calcular el coeficiente de transferencia de masa de la columna cromatográfica (k_L) (descrito en la Ec. 5 del Apéndice C5), es necesario conocer el valor de difusividad de la proteína en el gel escogido; sin embargo no se cuenta con ese dato para *rhBMP-2*, pero suponiendo una similitud de la solución con el agua, el cálculo del coeficiente de difusividad para una cromatografía de exclusión molecular se puede realizar por medio de la ecuación 5.16 (Hagel, 2011) (Tanford, 1961). En la Tabla 5.19 se presentan distintos valores de D para Sephacryl S-100, Colágeno y calculado según la ecuación mencionada, para proteínas de distinto peso molecular.

$$D_{25,H_2O} \approx 2,6 \cdot 10^{-5} \cdot M_r^{-\frac{1}{3}} \quad (Ec. 40)$$

Donde,

D: Difusividad en agua (a 25 °C) [cm²/s]

M_r: Masa molecular relativa del soluto [Da]

Tabla 5.19: Coeficientes de difusividad

Proteína	Peso Molecular [kDa]	Coeficiente de Difusividad [cm ² /s]		Fuente
		Sephacryl S-100	Ec. Tanford	
Cistatina	37,4	$8,6 \cdot 10^{-7}$ ^(a)	$7,77 \cdot 10^{-7}$	^a (Aatif, 2013) ^b (Fatima & Husain, 2008)
Peroxidasa	43	$8,17 \cdot 10^{-7}$ ^(b)	$7,42 \cdot 10^{-7}$	
rhBMP-2	30	-	$8,37 \cdot 10^{-7}$	

Al reemplazar con un peso molecular de 30 kDa, se obtiene una difusividad de $8,37 \cdot 10^{-7}$ [cm²/s], valor que no dista al compararse con los valores encontrados de otras proteínas para Sephadex S-100, por lo que se puede considerar como correcto y será utilizado en el diseño de la columna SEC.

Tabla 5.20: Datos para el diseño de la columna SEC.

Parámetro	Símbolo	Dato	Fuente
Diámetro partícula gel	d _p	47 [μm]	(Amersham Biosciences, 2002)
Velocidad superficial	v	20 [cm/h]	(United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013)
Densidad agua	ρ	1 [g/ml]	-
Viscosidad dinámica agua	μ	0,001 [Pa·s]	-
Coeficiente de difusividad	D	$8,37 \cdot 10^{-7}$ [cm ² /s]	Según Ec. 40 (Tanford, 1961)
Fracción de vacío	ε	0,35	(Williams & Hagel, 1999)

Por otro lado, se conoce que los valores típicos para Sephadex S-100 del volumen de matriz frente a volumen total de la cama, y la fracción de vacío (ε) son 25% y 35%, respectivamente (Williams & Hagel, 1999). Luego, suponiendo propiedades similares al agua (densidad y viscosidad) y utilizando los datos presentados en la Tabla 5.20 junto con las ecuaciones Ec. 5 y Ec. 6 de Apéndice C.5 se obtienen los valores de k_L y a.

$$k_L = 1,17 \cdot 20 \left[\frac{cm}{h} \right] \cdot \left(\frac{0,0047 [cm] \cdot 20 \left[\frac{cm}{h} \right] \cdot 1 \left[\frac{g}{cm^3} \right]}{0,01 \left[\frac{g}{cm \cdot s} \right] \cdot \frac{3600 s}{1h}} \right)^{-0,42} \cdot \left(\frac{0,01 \left[\frac{g}{cm \cdot s} \right]}{8,37 \cdot 10^{-7} \left[\frac{cm^2}{s} \right] \cdot 1 \left[\frac{g}{cm^3} \right]} \right)^{-0,67}$$

$$k_L = 0,528 \left[\frac{cm}{h} \right]$$

$$a = 6 \cdot \frac{(1 - 0,35)}{0,0047[cm]} = 829,79 \left[\frac{1}{cm} \right]$$

Entonces, el valor de la altura de una unidad de transferencia (HTU) se determina utilizando Ec.3 Apéndice C.5.

$$HTU = \frac{v}{k_L \cdot a} = \frac{20 \left[\frac{cm}{h} \right]}{0,528 \left[\frac{cm}{h} \right] \cdot 829,79 \left[\frac{1}{cm} \right]} = 0,0457 [cm]$$

Luego, al conocer el número teórico de platos (N) y HTU y por medio de la ecuación Ec. 9 Apéndice C.5, se puede calcular el largo (altura) teórico de la columna.

$$L = HTU \cdot N = 110,0 \cdot 0,0457 [cm] = 5,03 \cong 5,0 [cm]$$

Ahora, sabiendo que el volumen total de la columna empacada es de 1041,75 [ml] y que se trata de una forma cilíndrica donde el área basal multiplicado por el largo de la columna generan dicho volumen, se tiene que el diámetro de la columna queda determinado por la ecuación Ec. 41.

$$d_c = \left(\frac{4 \cdot 1041,75[cm^3]}{5 [cm] \cdot \pi} \right)^{1/2} = 16,25 [cm] \quad (Ec. 41)$$

El diámetro obtenido no existe en los modelos de columna estándar encontrados en el mercado, sino que la disponibilidad de diámetros se reduce a 14 [cm] y 20 [cm]. Las columnas escogidas corresponden a columnas AxiChrom de GE Healthcare (ver Figura 5.13) diseñadas para efectos industriales que requieren altos estándares de higiene de producción en pequeña escala de biomoléculas (GE Healthcare, 2012). En la Tabla 5.21 se establecen las características de las columnas de diámetros (140 y 200 [mm]).

Tabla 5.21: Alturas SEC para columnas 140 y 200.

Características Proveedor		Altura Calculada [cm]	N	Caudal [ml/min]
Diámetro Columna [cm]	20,0	3,32	72,6	104,7
Área transversal [cm ²]	314,0			
Diámetro Columna [cm]	14,0	6,76	148,1	51,3
Área transversal [cm ²]	154,0			



Figura 5.13: Columnas Cromatográficas. (GE Healthcare, 2012).

Para escoger qué columna es la adecuada, se utiliza un criterio de escalamiento, en el que se recomienda utilizar columnas más bajas y anchas; pero manteniendo como criterio mantener la razón de velocidad superficial y largo que se define a escala pequeña (Belter *et al*, 1988). De esta manera, se realiza la comparación entre las razones v/L para cada uno de los diámetros (ver Tabla 5.22) y se opta por la que mantiene mayor cercanía la de diseño, es decir, el diámetro de columna final es de 14 [cm] y las características nominales se presentan en la Tabla 5.23. Entonces, la altura de columna empacada corresponde a la calculada de acuerdo al volumen establecido (1041,75 [ml]) en la Tabla 5.19.

Tabla 5.22: Tabla comparativa de razones v/L.

Diámetro [cm]	Razón v/L
16,25	3,98
20	6,03
14	2,96

Por otro lado, conociendo la velocidad superficial a utilizar (v), la altura de la columna (L) y los volúmenes (CV) de las etapas de equilibrado (Eq) y elución (El) (ver Tabla 5.20), se puede establecer un tiempo de duración aproximado de esta cromatografía (Ec. 42).

$$t = \sum_i \frac{L \cdot CV_i}{v_i} \quad (Ec. 42)$$

Donde, “ i ” corresponde a cada etapa (Equilibrado, Carga, Lavado, Elución).

$$t = \frac{L}{v} \cdot CV_{Eq} + \frac{L}{v} \cdot CV_{El} = \frac{6,76 \text{ [cm]}}{20 \left[\frac{\text{cm}}{\text{h}} \right]} \cdot (1 + 1) \cdot \frac{60 \text{ cm}}{1 \text{ h}} = 40,59 \cong 41 \text{ [min]}$$

Si se adiciona el tiempo de carga, que corresponde al 4% de volumen de columna empacada como se menciona anteriormente, no aumentaría considerablemente, ya que la altura a que equivale ese volumen de carga (aprox. 42 [ml]) es de 0,27 [cm] (considerando el mismo diámetro de 14 [cm] de la columna); lo que finalmente se traduce a un tiempo de carga de menos de un minuto. De esta manera y para entregar un margen, se estima que el tiempo total ocupado en la SEC es de 45 [min]. Finalmente los datos proporcionados por el fabricante así como los calculados para realizar la SEC se resumen en la Tabla 5.23.

Tabla 5.23: Tabla resumen de características columna AxiChrom 140.

Característica	Parámetro	Unidad	Valor
Columna ^(a)	Diámetro Columna	[mm]	140
	Área Columna	[cm ²]	153,9
	Altura Columna	[cm]	50
	Altura Lecho (min - máx)	[cm]	5,0 - 35,0
	Volumen Lecho (min - máx)	[l]	1,54 - 4,62
Operación	Altura Lecho	[cm]	6,8
	Tiempo SEC	[min]	45

^(a) Datos obtenidos de (GE Healthcare, 2012)

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (C-1)

Así como en el diseño de todo el proceso de purificación, se tiene como referencias los datos proporcionados por la patente US 2013/0060012 A1 que son presentados en la Tabla 5.24. En dicha patente se recomienda para la operación de HIC gel Butyl Sepharose 4 Fast Flow (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013), utilizado generalmente en la purificación de proteínas que poseen una hidrofobicidad media; tratándose de un medio compuesto por uniones entre matrices de agarosa, donde, al igual que en los geles utilizados en SEC, la porosidad queda determinada por el grado de combinación de estas matrices (Amersham Biosciences, 2002). En concordancia al procedimiento descrito, se decide utilizar gel Butyl Sepharose® 4 Fast Flow de GE Healthcare (antes Amersham Biosciences) (Amersham Biosciences, 2002), cuya característica principal es poseer una composición de 4% de agarosa unida a ligandos de tipo butil (Amersham Biosciences, 2002).

Tabla 5.24: Parámetros operacionales de HIC. (United States Patente nº US 2013/0060012 A1, 2013).

Etapas	Parámetro	Rango Deseado
Todas las Etapas	Presión	≤ 10 psi
	pH	$7,0 \pm 0,2$
Equilibrado	Velocidad de flujo	60 [cm/h]
	Volumen	3 CV
Carga	Conductividad	89 - 90 [mS/cm]
	Velocidad de flujo	30 [cm/h]
	Volumen	2 CV
	Conductividad	89 - 90 [mS/cm]
Lavado	Velocidad de flujo	60 [cm/h]
	Volumen	3 CV
	Conductividad	65 - 66 [mS/cm]
Elución	Velocidad de flujo	30 [cm/h]
	Volumen	2 CV
	Conductividad	45 - 46 [mS/cm]

En las HIC conocer la hidrofobicidad de la macromolécula permite predecir el comportamiento de la misma en la cromatografía (Mahn, 2012); sin embargo, en este caso, ese valor para *rhBMP-2* es desconocido. Por otro lado, se sabe que una proteína globular tiene aproximadamente un 45% de residuos hidrofóbicos en su superficie y un 55% de residuos cargados o hidrofílicos (Janson & Jönsson, 2011), por lo que se podría asumir para el diseño que ésta cumple con un 45% de residuos hidrofóbicos. A pesar de ello, no se conocen estudios que puedan una afinidad con el gel de Butil-Sefarosa utilizado en este caso, lo que no permite establecer algún tipo de coeficiente de difusividad relativamente aproximado. Además, según los distintos diseños encontrados en bibliografía, se concluye que a diferencia de las columnas SEC en este caso el diseño por lo general se realiza conociendo algún perfil cromatográfico a escala laboratorio que permita conocer el número de platos y la altura de la columna por medio de métodos gráficos y no por aplicación de teorías.

Luego, al no contar con los datos y perfiles cromatográficos necesarios, y notar que en el diseño de la columna SEC finalmente se escoge un diámetro que esté disponible en el mercado, se decide adaptar el diseño utilizando el mismo tipo de columna AxiChrom de GE Healthcare (ver Figura 5.12). En este caso, a diferencia del diseño de SEC, no se define que la carga corresponda al 4% del volumen de columna empacado sino que se conoce el dato proporcionado por la patente relacionado al volumen de carga (2 CV) (ver Tabla 5.24). Así, conociendo que el volumen de carga (V_{carga}) de 6,25 [l] que

ingresaría a la columna proveniente de la UF, se puede establecer un volumen total de columna (V_c) (Ec. 43) y a partir del diámetro escogido, calcular la altura correspondiente.

$$V_{carga} = 2 \cdot V_c \quad (Ec. 43)$$

$$V_c = \frac{6,25[l]}{2} = 3,125[l] = 3125 [ml]$$

De esta manera y nuevamente comparando entre los diámetros 14 y 20 [cm] (ver Tabla 5.25) se tiene que en este caso, la columna de 20 [cm] cumple con la recomendación de utilizar columnas empacadas más bajas y anchas que largas y angostas (Belter *et al*, 1988). Teniendo finalmente una columna de largo cercanos a 10 [cm].

Tabla 5.25: Alturas SEC para columnas 140 y 200.

Características Proveedor		Altura Calculada [cm]	N	Caudal [ml/min]
Diam. Columna [cm]	20,00	9,95	384,9	157,0
Área transv. [cm ²]	314,00			
Diam. Columna [cm]	14,00	20,29	784,9	77,0
Área transv. [cm ²]	154,00			

Luego, de la misma manera que en SEC, se calcula un tiempo de operación aproximado utilizando la ecuación Ec. 42, esta vez considerando todos los volúmenes desde la etapa de carga hasta elución. En la Tabla 5.26 se resumen las características de la columna y de la operación de HIC.

$$t = 9,95 [cm] \cdot \left[\frac{(3 + 3)}{60 \left[\frac{cm}{h} \right]} + \frac{(2 + 2)}{30 \left[\frac{cm}{h} \right]} \right] \cdot \frac{60 cm}{1 h} = 139,33 \cong 140 [min]$$

Tabla 5.26: Tabla resumen de características columna AxiChrom 200.

Característica	Parámetro	Unidad	Valor
Columna ^(a)	Diámetro Columna	[mm]	200
	Área Columna	[cm ²]	314,2
	Altura Columna	[cm]	30
	Altura Lecho (min - máx)	[cm]	10,0 - 30,0
	Volumen Lecho (min - máx)	[l]	3,14 - 9,42
Operación	Altura Lecho	[cm]	10
	Tiempo HIC	[min]	140

^(a) Datos obtenidos de (GE Healthcare, 2012)

Sistema cromatográfico

Para ambos tipos de cromatografía (HIC y SEC) se considera el uso de un sistema automatizado FPLC ÄKTApilot (ver Figura 5.15 y Apéndice C.6) dirigido a producción de pequeña escala orientado a productos del área farmacéutico (GE Healthcare ÄKTA, 2010). Esta columna, asociada a un software permite tener un mayor control de todo lo que sucede en la cromatografía, desde el equilibrado hasta los volúmenes de elución correspondientes. Dada la flexibilidad de uso que presenta este equipo cromatográfico, que permite variar las conexiones y el control en el software, sería utilizado por ambas cromatografías variando sólo las columnas y tampones a utilizar, pero el software y la instalación sería común para ambas.

Además es importante destacar que para ambos tipos de cromatografía, dados los volúmenes de operación y los equipos escogidos, se operará de tal forma que no existe conexión directa por medio de alguna bomba con los sistemas cromatográficos y las operaciones que anteceden y proceden. En ambos casos, el líquido de interés será acumulado en recipientes sellados, por medio de mangueras que luego serán conectadas a los equipos cromatográficos. Para darle continuidad al proceso en el diagrama de flujo (Figura 5.19), se representan estos envases como los estanques E-8, E-9 y E-10.



Figura 5.14: Sistema ÄKTA pilot.

5.3.3 Resumen Etapa de Purificación

En la Tabla 5.27 se presentan los flujos de entrada y salida de cada una de las operaciones de recuperación y purificación de la proteína, según lo definido en la patente y lo calculado por diseño de equipos.

Tabla 5.27: Tabla de flujos en operaciones de recuperación y purificación.

Etapas	Entrada	Salida	Duración
UF	62,5 [l]	6,25 [l]	15 [min]
HIC	6,25 [l]	6,25 [l]	140 [min]
DF	6,25 [l]	41,67 [ml]	50 [min]
SEC	41,67 [ml]	1,04 [l]	45 [min]

Consumo Energético

En la Tabla 5.28 se resume además el consumo energético estimado para la etapa de purificación expresado según la potencia de los equipos involucrados. Se destacan la cantidad de equipos, ya que se cuentan aquellos que estarán en funcionamiento y si bien la etapa de UF cuenta con dos bombas

peristálticas es sólo una medida preventiva siendo sólo una de ellas la que funcione al llevarse a cabo la operación.

Tabla 5.28: Potencia de equipos en la etapa de purificación.

Etapa	Equipo	Potencia [W]	Cantidad de equipos
UF	Bomba peristáltica ^(a)	230	1
HIC	Sistema FPLC ^(b)	800	1
DF	Bomba peristáltica ^(a)	230	1
SEC	Sistema FPLC ^(b)	800	1

^(a) (Cole-Parmer, 2013)

^(b) (GE Healthcare, 2007)

5.4 FORMULACIÓN Y ENVASADO

Para llevar a cabo la etapa final de formulación y envasado, es necesario en primer lugar tomar alguna muestra y realizar diversos test en los que se corrobore la conformidad del producto con sus especificaciones y requerimientos. Luego el procedimiento contempla un filtrado de esterilización de 0,22 μm , se almacena en un recipiente estéril y luego a través de algún sistema automático de bombeo se realiza el llenado de los frascos finales de venta pre-esterilizados, para finalmente llevar los recipientes a un liofilizador (ver etapas en Figura 5.15) (Walsh, 2007). Como ya se ha mencionado, respecto al filtrado de esterilización se recomienda un filtro de 0,1 μm que asegure la retención de micoplasmas; además es importante recalcar que todo material debe estar en esterilizado y el ambiente debe corresponder a salas tipo A o B (ver en Apéndice C.8 las definiciones).

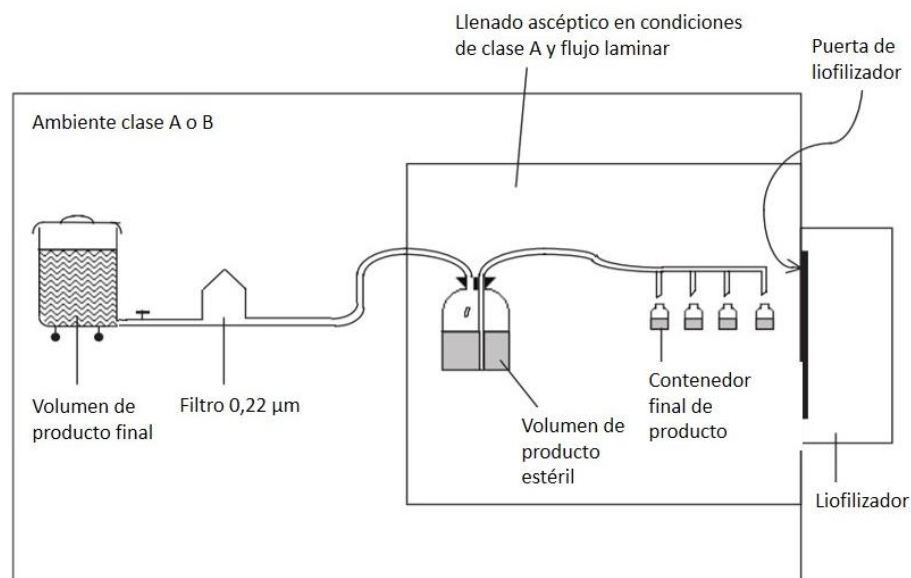


Figura 5.15: Proceso de envasado. (Walsh, 2007).

Si bien en este caso, no se realizará el diseño *per se* de los equipos, se recomienda un sistema de dosificación con filtro de esterilización incluido; y en el caso del liofilizado, se recomienda el uso de un equipo con bandejas que permita procesar frascos rellenos con proteínas.

5.5 EQUIPOS AUXILIARES

5.5.1 Sistema de purificación de agua (W-1)

Organismos como el American Society for Testing and Materials (ASTM), International Organization for Standardization (ISO), Clinical and Laboratory Standards Institute, U.S. Pharmacopeial Convention (USP), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), entre otros han determinado distintos estándares de calidad de agua categorizándola según tipo o grado; y aun cuando las clasificaciones de estas organizaciones no distan demasiado en los procedimientos de tratamiento del agua, si existen algunas diferencias en las clasificaciones y usos de dichas aguas. Un ejemplo de lo anterior se puede observar en la Tabla 5.29 en la que se comparan los tipos de agua definidos por el ASTM y la USP, pudiendo notar que a grandes rasgos las exigencias presentadas por ASTM superan a las de USP.

Tomando como referencia la clasificación USP, se puede decir que en la industria farmacéutica se utilizan básicamente dos tipos de agua, un agua purificada (PW) y otra altamente purificada (WFI por sus siglas en inglés de agua para inyección); ello debido a que incluso el agua potable estándar contiene contaminantes (microorganismos, material particulado, etc.) que podrían reaccionar directamente con la proteína o bien que pudieran generar efectos adversos en el paciente de ser dosificados en el producto final (Walsh, 2003). Los tipos de agua purificada se pueden obtener mediante un proceso de deionización; luego, para asegurar que el agua sea inocua, se puede llevar a cabo una ultrafiltración o bien una destilación (o algún proceso similar) que permita la remoción y/o inactivación de agentes pirógenos que pudieran estar presentes. En el proceso de deionización se reemplazan los iones contaminantes por iones H^+ u OH^- , estos sistemas consisten en resinas (catiónicas y/o aniónicas) que requieren una regeneración periódica con ácido y base; ácido clorhídrico o sulfúrico en el caso de resinas catiónicas, e hidróxido de sodio o potasio para resinas aniónicas (U.S. Pharmacopeial Convention, 2008).

Así, el PW y WFI se diferencian básicamente en uno o dos pasos de purificación (ver Figura 5.16) y en que el agua purificada se utiliza en la preparación de medio de cultivo y mientras que el WFI en la preparación de tampones requeridos en la purificación del producto, aunque existen algunos casos en los que WFI es utilizado en la preparación de medios de cultivo (Walsh, 2003).

Tabla 5.29: Tipificación de aguas purificadas según ASTM y USP

Parámetro	Tipo de Agua					
	ASTM				USP	
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	PW	WFI
Conductividad eléctrica máx. [μS/cm] (a 25 °C)	0,1	1,0	0,25	5,0	0,77	0,77
Resistividad eléctrica mín. [MΩcm] (a 25 °C)	18,0	1,0	4,0	0,2	1,3	1,3
pH (a 25 °C)	a	a	a	5,0 - 8,0	5,0 - 7,0	5,0 - 7,0
Carbono Orgánico Total (TOC) máx. [μg/l]	50	50	200	NL	< 500	< 500
Sodio máx. [μg/l]	1	5	10	50	-	-
Cloruros máx. [μg/l]	1	5	10	50	-	-
Sílice total máx. [μg/l]	3	3	500	NL	-	-
	Tipo A ^b	Tipo B ^b	Tipo C ^b		PW	WFI
Bacterias [CFU/100 ml]	1	10	1000		≤ 1000	≤ 10
Endotoxinas [EU/ml]	< 0,03	0,25	NA		NS	≤ 0,25
Fuente	(American Society fo Testing and Materials ASTM, 2011)				(Cheme Engineering Inc.)	

^a Las mediciones de pH Tipo I, II y III de agua reactivo han sido eliminadas de estas especificaciones porque estos valores de agua no contienen constituyentes en tales cantidad para afctar significativamente el pH.

^b La ASTM presenta además otra clasificación de Tipo A, B y C según su calidad bacteriológica y de endotoxinas.

* PW: Purified Water WFI: Water For Injection NA: No Aplicado NL: Sin Límite NS: No Especificado EU: Endotoxin Units

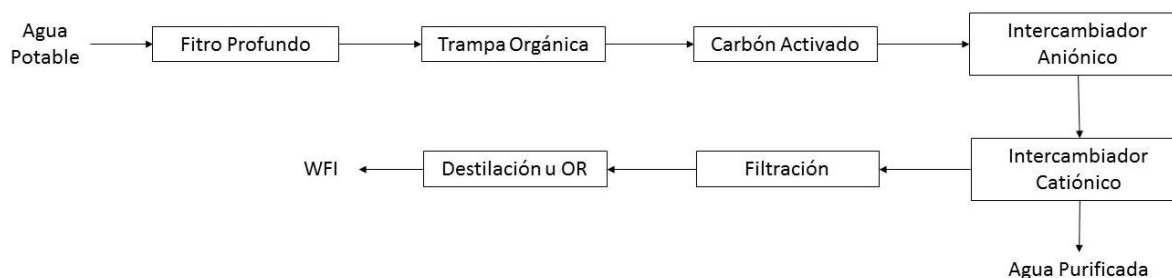


Figura 5.16: Proceso de purificación de agua USP. Traducido de (Walsh, 2003). Para la obtención de agua purificada se requieren pasos de filtración, deionización y finalmente para un agua altamente purificada (WFI) una destilación (o algún proceso que asegure una calidad de agua similar, p.ej. OR) para alcanzar la remoción o inactivación de agentes pirógenos. OR: Osmosis Reversa.

Por otro lado, según la ASTM, el agua utilizada en la industria farmacéutica para la preparación de buffers y en general en la producción de fármaco, corresponde a Tipo I; mientras que el agua Tipo II sería un análogo del agua PW, utilizado para limpieza de materiales y preparaciones de medio (sólo en casos de propósitos generales de laboratorio) (National Institute of Health NIH, 2013). Así como el WFI el agua Tipo I, también requiere una preparación por destilación y distintos pulidos por medio de distintos materiales de intercambio iónico; mientras que el agua Tipo II puede alcanzarse directamente por destilación pudiendo o no requerir pasos de osmosis reversa y absorción orgánica (American Society of Testing and Materials ASTM, 2011). De esta manera y pensando en alcanzar un estándar de producción elevado, se decide cumplir con los parámetros más exigentes (entregados por ASTM), lo que significa utilizar agua purificada Tipo II para el lavado de materiales y equipos utilizados en el proceso; mientras que para la preparación de medios y tampones utilizados en las operaciones de purificación de la proteína se utilizará agua altamente purificada Tipo I.

Respecto al requerimiento de agua, por razones expuestas en el Capítulo 6, se considera realizar la preparación de medio de cultivo para 4 días de perfusión cada dos días de operación; lo que significa disponer de un volumen de 250 [l] para los días en los que se programe la preparación de dicho medio. Por otro lado, considerando los volúmenes de trabajo de las etapas de purificación se obtiene un volumen requerido de agua Tipo I de 45,7 [l/d] (ver cálculo en Apéndice C.7).

Analizando la oferta existente y suponiendo que la planta cuenta con agua potable, según las características de la Norma Chilena NCh 409, tal que pueda utilizarse como materia prima para la generación de aguas Tipo I y II, se opta por utilizar equipos marca Thermo Scientific modelo LabTower EDI™ capaces de generar ambos tipos de agua según se requiera (ver Figura 5.17), pudiendo entregar hasta 200 [l/d] cada uno de agua tratada con las características presentadas en la Tabla 5.30. Este equipo incluye un módulo de electrodeionización (EDI) (en el que las resinas son continuamente regeneradas de forma eléctrica, evitando el uso adicional de químicos), cartridge pulimiento ultrapuro, membrana de osmosis reversa (en lugar de destilación), filtros de pretratamiento de OR de 5 [μm] y estabilizadores de dureza, lámpara UV, filtro de esterilidad de 0,2 [μm], estanque de reserva de 100 [l], filtro de 1 [μm] para la salida del estanque de reserva, y reguladores de presión (Cole-Parmer, 2013).



Figura 5.17: LabTower EDI™

Considerando que se requieren 250 [l] de agua Tipo I sólo para preparar medio, además del agua necesario para tampones; y que adicionalmente se debe contar con agua Tipo II para limpieza de material, se decide utilizar dos equipos purificadores de agua (W-1 y W-2) tal que proporcionen con holgura el requerimiento de aguas.

Tabla 5.30: Características Agua Purificada por LabTower^{EDITM}. (Cole-Parmer, 2013).

Parámetro	Tipo de Agua	
	Tipo I	Tipo II
Conductividad eléctrica máx. [$\mu\Omega/\text{cm}$]	0,055	0,067 - 0,1
Resistividad eléctrica mín. [$M\Omega\text{cm}$] (a 25 °C)	18,2	15,0 - 10,0
Partículas [$\mu\text{m}/\text{ml}$]	< 1	-
Carbono Orgánico Total (TOC) máx. [$\mu\text{g}/\text{l}$]	1,0 - 5,0	-
Bacterias [CFU/ml]	< 1	-

Respecto al almacenamiento de este tipo de agua cada equipo de purificación ya contiene un estanque de almacenamiento apropiado que acumula hasta 100 [l], sin embargo para entregar mayor flexibilidad de acción ante cualquier eventualidad, se prefiere disponer de un estanque de 300 [l] (E-2) en el que constantemente se almacene agua destinado a medio de cultivo. De la misma manera, y dado que los tipos de agua I y II no pueden estar contenidos en el mismo recipiente, se decide contar con un estanque especial para acumular agua Tipo II, con capacidad para 100 [l] (E-1); para ambos casos se recomienda el uso de estanques de acero inoxidable (Walsh, 2003). Operacionalmente, se recomienda dejar uno de los sistemas de purificación de agua destinado únicamente a la producción de agua Tipo I para medio de cultivo; y dado que produce 200 [l/d] pero que el estanque de almacenamiento tiene capacidad para 100 [l], se deberá realizar un vaciado del mismo dos veces al día. Mientras que el otro estanque puede funcionar produciendo ambos tipos de agua según se requiera, proporcionando el agua para el estanque E-1.

El diseño de ambos estanques sería de geometría similar a los estanques de preparación de medio de cultivo (en este caso sin impulsores ni deflectores) (ver Subsección 5.2.2) y cuyas medidas son presentadas en la Tabla 5.31. Estos estanques deben considerar puertos de carga y descarga.

Tabla 5.31: Dimensiones de estanque E-1 y E-2

Dimensión	E-1	E-2
T [cm]	46	66
H _L [cm]	46	66
J [cm]	5	7
D [cm]	15	22
A [cm]	17	25
C [cm]	15	22
H [cm]	78	112

Consumo Energético

El consumo asociado a la purificación de agua está principalmente determinado por el equipo purificador, lo que significa una potencia de 360 [W] por equipo. Este valor se determinó según el voltaje de 240 VAC presentado en el catálogo (Cole-Parmer, 2013) y asumiendo un amperaje de 1,5 [A] (dato estimado según los amperajes calculados para otros equipos en los que se contaba con la potencia y el voltaje). Para mayor información ver Apéndice C.10.

5.5.2 Bombas

Respecto a las bombas utilizadas en este proceso, dados los bajos flujos y al tratarse de un proceso que requiere altos índices de esterilidad, se opta por trabajar con bombas peristálticas; ya que generan un bajo esfuerzo de corte, permiten cambiar el sentido del flujo en caso de cualquier taponamiento en las vías, y por sobre todo no tienen contacto directo con el producto. Además, al utilizar mangueras como medio de transporte se tiene la opción de continuar con la línea de lo desechable, asegurando utilizar nuevas mangueras completamente esterilizadas para cada lote o bien esterilizarlas en autoclave.

Por otro lado, como ya se ha mencionado en el diseño los sistemas de UF, DF y los sistemas cromatográficos cuentan con sus propias bombas peristálticas y los últimos además operarán a partir del almacenamiento del líquido con producto en recipientes aislados y no de forma continua. De esa manera y tal como se observa en el diagrama de flujo (ver Figura 19) las únicas bombas que se deben diseñar corresponden a las destinadas a transportar el agua Tipo I hacia el estanque de preparación de medio y luego llevar el medio preparado hacia el sistema de filtración y a la bolsa SU de almacenamiento. Es importante mencionar que al ser bombas peristálticas y de laboratorio, de haber algún imperfecto con alguna, se puede utilizar otra en su lugar siempre que cumpla con las mismas características; y dado que se cuenta en el diseño con bombas iguales para distintas operaciones, no se decide incorporar bombas adicionales.

Bombas para el transporte de agua (B-1, B-2, B-3 y B-6)

Estas bombas deben transportar el agua desde cada equipo purificador de agua (W-1, W-1) hasta el estanque de preparación de medio (E-2), al estanque de almacenamiento de agua Tipo II (E-1) y desde el estanque E-5 al estanque E-6.

En este caso, se escoge un cabezal de bomba peristáltica I/P® 82 Masterflex que entrega un flujo de hasta 13 [l/min] (Cole-Parmer, 2013) (ver Figura 5.17), se recomienda no operar a su máxima capacidad sino que a 10 [l/min], lo que permitiría vaciar el estanque de almacenamiento de W-1 y W-2 en 10 [min], tiempo considerado adecuado. Además, se requiere una manguera de diámetro interno (ID) de 1/2 [in] y de un material que sean no tóxico y que resista altas presiones de descarga; para el tipo de bomba seleccionada están disponibles las mangueras PharmaPure® comercializadas en longitudes de 7,6 [m] (Cole-Parmer, 2013). Las características de las mangueras serían adecuadas, considerando una distancia de aproximadamente 4 [m] entre los equipos W-1 y W-2 con E-1, E-2 y E-3

y que los estanques E-6 y E-7 presentan puertos o conexiones de 1/2 [in] (Sartorius Stedim). Además se debe considerar la inclusión del motor de la bomba que permita dicho flujo, operando hasta 650 [rpm] y cuya potencia se incluye en la Tabla 5.28.

Las bombas escogidas corresponden a las bombas B-1, B-2, B-3 y B-6. Es importante destacar que si bien en el diagrama de flujo se presentan 2 bombas relacionadas al equipo W-1, se trata de la misma bomba que operaría en ambas líneas (hacia los estanques E-1 y E-2) en distintos momentos; de la misma manera la bomba B-3 se utilizaría para el vaciado del estanque E-2 tanto hacia E-3 como a E-4 transportando a cada uno 125 [l].

Bomba para el transporte de medio (B-4 y B-5)

En este caso, el filtro de esterilización permite un flujo de 0,7 [l/min] y presenta un diámetro de entrada de 1/4 [in] (Merck Millipore, 2012) lo que implica que la elección de la bomba en este caso está limitada a las condiciones del equipo que recibe el flujo. De acuerdo a lo anterior, las opciones se reducen a mangueras de ese diámetro (antes de optar por incorporar algún tipo de fitting que adecue el tamaño) y la manguera de ese diámetro disponible permite transporta un flujo de hasta 1,7 [l/min] (Cole-Parmer, 2013), lo que admitiría el flujo deseado. Así, nuevamente se escogen mangueras PharmaPure® vendidas en longitudes de 7,6 [m] y nuevamente se supone que ese formato es adecuado. Asimismo se selecciona un motor que permite un funcionamiento de 20 a 60 [rpm] con potencia presentada en la Tabla 5.32.

Tabla 5.32: Resumen condiciones operacionales de las bombas

Característica	Equipo	
	A	B
Tipo de Bomba	Peristáltica	Peristáltica
Flujo a transportar [l/min]	10	0,7
Velocidad máx. [rpm]	650	600
Diámetro manguera [in]	1/2	1/4
Potencia [W]	506	208
A: Bombas B-1, B-2, B-3 y B-6		B: Bombas B-4 y B-5



Figura 5.18: Cabezal y motor de bomba peristáltica I/P® 82 Masterflex. (A) Bomba B-KJ I/P® 82 Masterflex (B) Bomba B-798 L/S® 17 Easy Load® Masterflex (Cole-Parmer, 2013).

5.6 CONSUMO ANUAL HÍDRICO Y ENERGÉTICO

El cálculo del consumo anual de agua y electricidad se realizó siguiendo la metodología explicada en el Apéndice C.9. En las Tablas 5.33 y 5.34 se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los suministros.

Tabla 5.33: Consumo anual de agua

Tipo de agua	Uso	[l/año]
Tipo I	Buffer	10.970,9
	Medio	22.275,0
Tipo II	Estanque	11.166,7
Total		44.412,5

Tabla 5.34: Consumo anual de electricidad

Etapas	Nombre	Equipo	Potencia [W]	Cantidad de equipos en funcionamiento	Consumo [kWh/año]
Propagación	-	Shaker	200	1	115,20
	-	Agitador Magnetico	800	1	864,00
Producción	E-3; E-4	Estanque Medio	200	2	187,20
	E-5; E-6	Estanque Flexel	300	2	4.406,40
	R-1	Reactor	6389	1	49.680,86
Recuperación	UF-1	Equipo UF	230	1	17,60
Y Purificación	C-1	Equipo HIC	800	1	591,60
	UF-2	Equipo DF	230	1	70,38
	C-2	Equipo SEC	800	1	204,00
Equipos	W-1; W-2	Purificador Agua	360	2	5.702,40
Auxiliares	B-1; B-2; B-3; B-6	Bomba	506	4	157,87
	B-4; B-5	Bomba	208	2	194,69
TOTAL					62.192,20

5.7 DIAGRAMA DE FLUJO

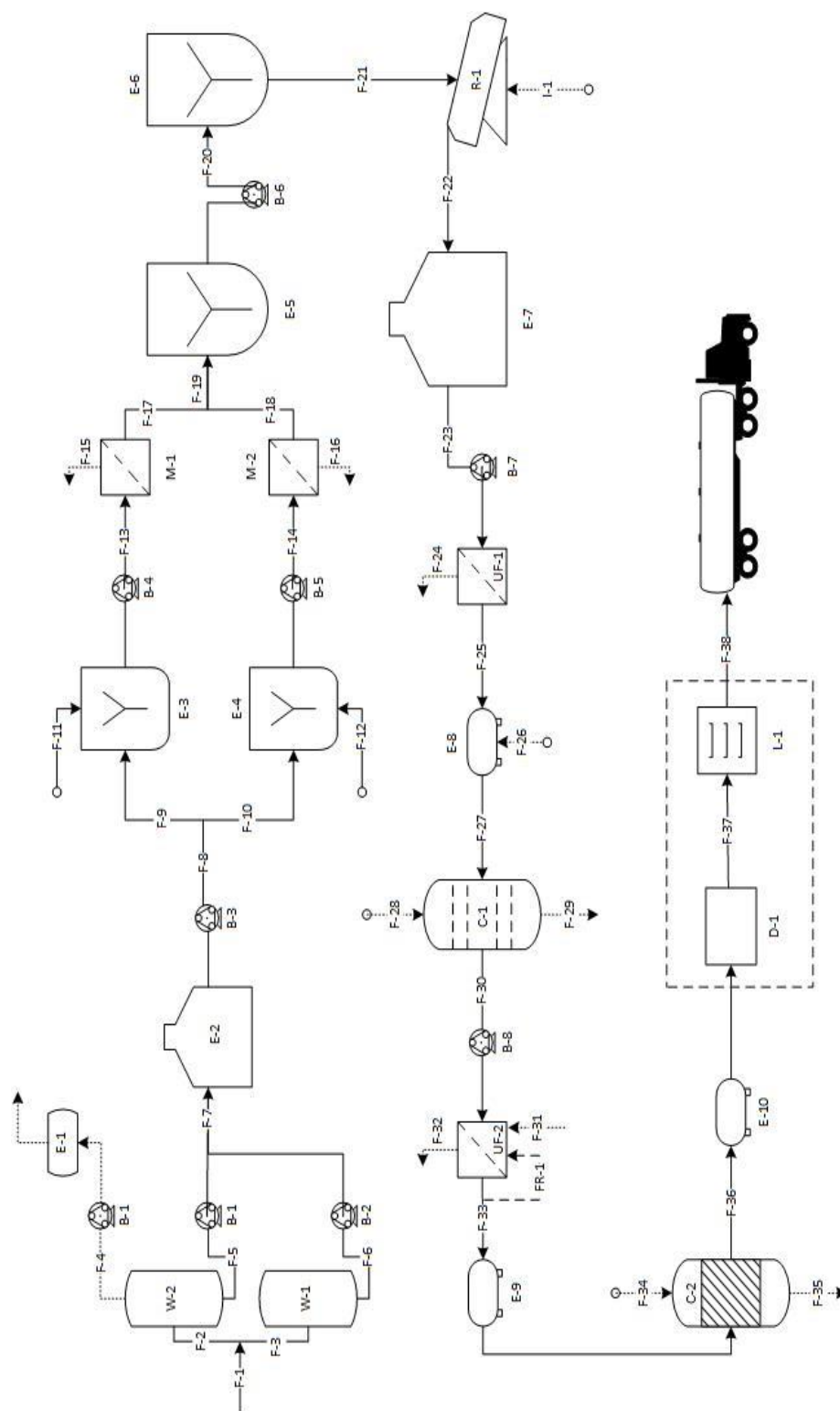


Figura 5.19: Diagrama de flujo

5.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 5

- Aatif, M. (2013). *Purification and characterization of cystatin from goat muscle*. Aligarh Muslim University, Department of Biochemistry.
- Abidin, Z., & Anuar. (2011). Comparisson of the production of recombinant protein in suspension culture of CHO cells in spinner flask and shake flask system. *IIUM Engineering Journal: Special Issue on Biotechnology*, 12(4), 43 - 49.
- Acevedo, F. (2002). Capitulo 7: Transferencia de masa, momento y calor en fermentaciones. En J. C. Fernando Acevedo, & A. Illanes, *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (págs. 183 - 212). Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Adams, T., Noack, U., Frick, T., Greller, G., & Fenge, C. (May de 2011). Increasing Efficiency in Protein Supply and Cell Production by Combinig Single-use Bioreactor Techninology and Perfusion. *BioPharm International, Supplement to BioPharm International: Advances in Fermentation and Cell Culture*, s4 - s11.
- American Society fo Testing and Materials ASTM. (2011). Recuperado el Noviembre de 2013, de ASTM International: <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D1193-99E1.htm>
- Amersham Biosciences. (2002). Data File: Hydrophobic Interaction Chromatography. *Butyl Sepharose 4 Fast Flow BioProcess Media*.
- Amersham Biosciences. (2002). Handbooks from Amersham Biosciences. *Gel Filtration: Principles and Methods*(18-1022-12).
- Belter, P. A., Cussler, E., & Hu, W.-S. (1988). Elution Chromatography. En P. A. Belter, E. Cussler, & W.-S. Hu, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology* (págs. 183 - 220). John Wiley & Sons.
- Brawn Mixer, Inc. . (2003). *Principles of Fluid Mixing*, 8.1 - 8.9.
- Cheme Engineering Inc. (s.f.). *Cheme.ca*. Obtenido de http://cheme.ca/Doc/USP_Water_Criteria.pdf
- Cole-Parmer. (2013). *Catálogo 2013/14 Cole-Parmer*. Recuperado el 2013, de http://www.coleparmer.com/Product/Thermo_Scientific_Barnstead_LabTower_EDI_Water_Purification_System_30_l_hr/EW-99281-30
- Couper, J. R., Penney, W. R., Fair, J. R., & Walas, S. M. (2012). Reactors. En J. R. Couper, W. R. Penney, J. R. Fair, & S. M. Walas, *Chemical Process Equipment: Selection and Design* (págs. 591 - 653). Elsevier.
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Waltham: Academic Press.

- Doran, P. M. (2013). Part 3 Physical Processes. En P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles* (págs. 201 - 593). Waltham: Academic Press.
- Doran, P. M. (2013). Part 4: Reactions and Reactors . En P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles* (págs. 599 - 852). Elsevier.
- Fatima, A., & Husain, Q. (2008). Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from Bitter Gourd (*Momordica charantia*). *Protein & Peptides Letters*, 15(4), 377 - 384.
- GE Healthcare. (2012). *AxiChrom 140 and 200 columns: Operating Instructions*.
- GE Healthcare ÄKTA. (2010). *ÄKTA Protein purification by design*.
- Hagel, L. (2011). Gel Filtration: Size Exclusion Chromatography. En Jan-Christer Janson, *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications* (Third Edition ed., págs. 51 - 92). John Wiley & Sons, Inc.
- Hemrajani, R. R., & Tattersson, G. B. (2003). Mechanically Stirred Vessels. En E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng, & S. M. Kresta, *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice* (págs. 345 - 390). John Wiley & Sons Inc. .
- Janson, J.-C., & Jönsson, J.-A. (2011). Introduction to Chromatography. En J.-C. Janson, *Protein Purification: Principles, High Resolution, Methods and Applications* (Third Edition ed., págs. 25 - 50). Wiley & Sons, Inc.
- Lutz, H., & Raghunath, B. (2007). Chapter10: Ultrafiltration Process Design and Implementation. En A. A. Shukla, M. R. Etzel, & S. Gadam, *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry* (págs. 297 - 332). Taylor & Francis Group.
- Mahn, A. (2012). Hydrophobic Interaction Chromatography: Fundamentals and Applications in Biomedical Engineering. En D. N. Ghista, *Biomedical Science, Engineering and Technology* (págs. 603 - 628). InTech.
- Merck Millipore. (2012). Data Sheet. *Sterilizing-grade Durapore 0.1 um and 0.22 um Hydrophilic Filters*.
- Millipore. (2004). *Pellicon 2 Filters and Holders*.
- National Institute of Health NIH. (2013). *Laboratory Water: Its Importance and Application*. The National Institutes of Health, Division of Technical Resources: Office of Research Facilities.
- Oxoid Limited. (2013). *Thermo Scientific*. Recuperado el Noviembre de 2013, de Sitio web de Oxoid Microbiology Products:
<http://www.oxoid.com/UK/blue/techsupport/its.asp?itsp=faq&faq=tsfaq011&cat=culture+media%2C+supplements+and+raw+materials&lang=EN&c=UK>

- Russell, E., Wang, A., & Rathore, A. S. (2007). Chapter 1: Harvest of a Therapeutic Protein Product from High Cell Density Fermentation Broths: Principles and Case Study. En A. A. Shukla, M. R. Etzel, & S. Gadam, *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry* (págs. 1 - 58). Taylor & Francis Group.
- Sartorius. (s.f.). *Sitio web de Sartorius*. Recuperado el 2013, de <http://www.sartorius.com/en/product/product-detail/16694-2-50-06/?productRelation=1&cHash=189d1ba3d4a4c4ba1986c5d202fd233d>
- Sartorius Stedim. (s.f.). *Standard Flexel 3D bioprocessing bags for Palletank*.
- Sartorius Stedim Biotech. (2011). *Operating Instructions BIOSTAT RM 20/50 basic*. Obtenido de http://www.sartorius.com/fileadmin/media/global/products/Manual_BiostatRM_20-50_Basic_SE-6049-a.pdf
- Sartorius Stedim Biotech. (2011). *Sartorius*. Recuperado el Octubre de 2013, de www.sartorius-stedim.com
- Sartorius Stedim Biotech. (2013). *Sartorius*. Recuperado el Octubre de 2013, de http://fenix-sd.com/content/user_files/File/BIOSTATCultiBagRM.pdf
- Sartorius Stedim Biotech. (s.f.). *Sartorius*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://www.sartorius.com/en/products/laboratory/bioreactors-fermentors/single-use-bioreactors/>
- Sartorius Stedim. (s.f.). Fluid Management Systems. *Flexel 3D LevMix System for Drum*.
- Shim, Y.-B., Kim, Y.-S., Choi, Y.-R., & Jang, J.-W. (2013). *United States Patente nº US 2013/0060012 A1*.
- Shukla, A. A., & Yigzaw, Y. (2007). Modes of Preparative Chromatography. En A. A. Shukla, M. R. Etzel, & S. Gadam, *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry* (págs. 179 - 226). CRC Press.
- Tanford, C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons, Inc.
- U.S. Pharmacopeial Convention. (2008). <1231> Water for Pharmaceutical Purposes. 1 - 50.
- Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. Great Britain: Wiley.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Williams, A., & Hagel, L. (1999). Size Exclusion for Analysis and Purification of Aqueous Macromolecules. En C.-s. Wu, *Column Handbook of Size Exclusion Chromatography* (págs. 27 - 74). Academic Press.

CAPÍTULO 6

ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA

El modelo organizacional de una planta de producción debe responder a la capacidad de administrar sus recursos disponibles en función de una correcta operación entre las distintas áreas de la empresa, con el fin de integrar las funciones técnicas, comerciales, financieras, contables y de seguridad a través de técnicas de planificación, organización, dirección, coordinación y de control (Chiavenato, 2007).

La organización de los diversos aspectos involucrados en la producción y manufactura de un determinado producto, adquiere especial relevancia si se entiende como el acto de organizar, estructurar y destinar los recursos, definir los órganos encargados de la administración y fijar sus atribuciones e interrelaciones (Chiavenato, 2007).

Dadas las características de la planta diseñada, es que se propone un modelo de organización funcional, el cual incluye la creación de puestos, equipos y departamentos con base en las actividades especializadas. El agrupamiento funcional de los empleados es la forma de más amplio uso y aceptación de dividir por departamentos.

El diseño funcional permite la identificación y asignación clara de responsabilidades y los empleados lo comprenden con facilidad. Las personas que realizan tareas similares y se enfrentan a problemas parecidos trabajan juntas, con lo que se incrementan las posibilidades de interacción y respaldo correspondido (Hellriegel & Slocum, 2004). Se establece una jerarquía y se dividen responsabilidades de acuerdo a la relevancia del cargo en el proceso.

Es necesario hacer énfasis en que el éxito de un modelo de organización, radica en las personas identificando a los recursos humanos como uno de los más importantes para el desarrollo de cualquier empresa o sistema productivo. Teniendo esto en cuenta, es que a lo largo de este capítulo se detalla la forma en que se organizan los recursos de la planta de producción para cumplir con la función administrativa, organizando a los trabajadores, las tareas a realizar y especificando la distribución espacial de la planta.

6.1 ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA

El objetivo de este proyecto es diseñar un proceso de producción de *rhBMP-2*, el cual será vendido a algún laboratorio farmacéutico ya existente debido a las características del mercado en Latinoamérica. Es por esta razón, que el proceso deberá acoplarse a la figura organizacional que posea la empresa que compre el diseño, por lo que no tiene sentido estructurar la planta en función de departamentos como Recursos Humanos, Marketing o Finanzas ya que de ninguna manera serían creados.

Considerando lo anterior es que se propone desarrollar la organización administrativa en función del área de producción únicamente.

En la Figura 6.1 se ve representado el modelo de organización funcional de la planta, en el cual se aprecia que la función administrativa será la encargada de la dirección global de la planta y que a su vez estará a cargo de coordinar y dirigir las tres áreas o departamentos principales.

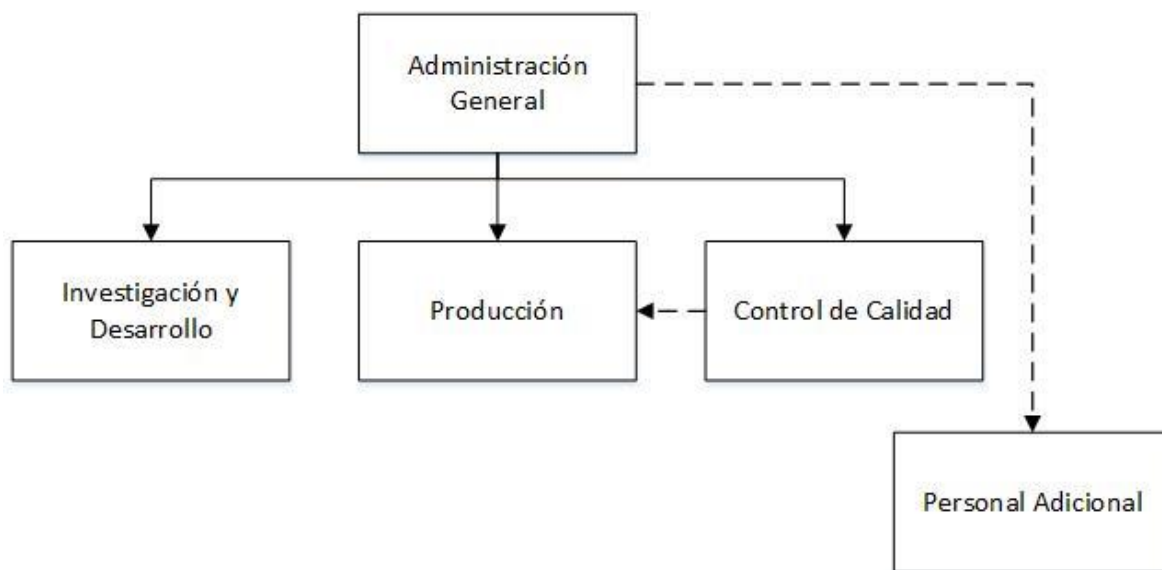


Figura 6.1: Organización administrativa de la planta.

6.1.1 Secciones de Trabajo

A continuación se explicará la estructura propuesta justificando cada una de las secciones de trabajo que se presentan.

Sección Administrativa

Esta sección deberá cumplir con las funciones administrativas de la planta, coordinando los requerimientos y órdenes de compra de materias primas, insumos y equipos; planifica y organizar los flujos de dinero de la planta y pagar las remuneraciones al personal en forma responsable, además de planificar la producción.

La persona a cargo de esta sección deberá ser un profesional con sólidos conocimientos de la ingeniería de procesos y de modelos de administración, con gran capacidad de gestión, preparado para la óptima utilización de los recursos disponibles a través de una labor de creación y/o adaptación tecnológica, en procesos destinados al óptimo aprovechamiento de la materia y energía de origen biológico. Sus principales funciones se relacionan con el diseño, planificación, coordinación y evaluación de sistemas productivos, empresas o industrias en las cuales la materia prima o el agente de transformación sean de origen biológico.

Sección de Producción

En esta sección es donde se desarrollará el producto que será comercializado, abarcando desde la recepción y preparación de la materia prima, el proceso de propagación de la línea celular y su posterior cultivo, incluyendo además todo el proceso de recuperación y purificación.

Esta sección estará a cargo de un profesional preparado para la aplicación del conocimiento tecnológico a procesos caracterizados por la participación de agentes biológicos. Sus principales funciones se relacionan con el montaje, puesta en marcha, operación y mantención de equipos y procesos, debiendo ejecutar, administrar, fiscalizar, emitir juicios técnicos independientes y asumir responsabilidad personal por tareas en el campo de la ingeniería.

Sección de Investigación y Desarrollo

Esta sección tendrá dos líneas principales de investigación; por un lado tendrán la tarea de estudiar y analizar posibles mejoras u optimizaciones del proceso productivo, ya sea el estudio de mejoras

para el medio de cultivo, para el funcionamiento de equipos, estudios sobre la línea celular, etc, y por otro lado habrá una línea de investigación a cargo de desarrollar la matriz de colágeno para incorporar la capacidad de soporte a la *rhBMP-2* (que en este estudio no se abarca mayormente en función de los objetivos planteados).

Es importante que quién se encuentre a cargo de esta sección sea un profesional con conocimientos sólidos en procesos bioquímicos y sistemas productivos, capaz de unir la visión científica sobre un hecho con la mirada ingenieril necesaria para aumentar la productividad y eficiencia de la planta. Es de suma importancia que en esta sección haya un equipo multidisciplinario de planta, y además posean la capacidad de contratar asesores externos, con el fin de enriquecer la pluralidad de conocimientos en torno a una investigación.

Sección de Control de Calidad

Esta sección será la responsable de realizar los ensayos necesarios para asegurar la correcta caracterización del producto y verificar si se cumplen con los requisitos estandarizados para su comercialización en función de estándares de calidad internacional y de la legislación vigente de los países que se pretenden abarcar. Debe analizar y asegurar la calidad y estado de las materias primas e insumos que sean utilizados en el proceso.

Esta sección debe componerse por distintas disciplinas con el fin de tener distintos perfiles profesionales; uno enfocado a la capacidad de controlar los procesos y subprocesos relacionados con la elaboración de productos y/o prestación de servicios, utilizando técnicas de Control de Calidad y Control Estadístico de Procesos, ejecutar las actividades de los Sistemas de Gestión de Calidad y Ambiente, según normativas vigentes y mantenerlos actualizados, además de controlar el cumplimiento de las normas de prevención de riesgos y seguridad industrial en referencia a los diferentes procesos internos de la organización. Y otro enfocado a implementar los procedimientos para el análisis físico-químico y biológico en todas las etapas del proceso de la industria, de acuerdo con las normativas vigentes, controlar la calidad de materias primas de productos terminados y residuos, de acuerdo con los estándares del laboratorio y normativa vigente, desarrollando información técnica, para todas las etapas del proceso productivo en la industria.

6.2 ORGANIZACIÓN DE PERSONAS

6.2.1 Cargos Necesarios por Sección de Trabajo

En consideración a las secciones de trabajo establecidas para el correcto funcionamiento de la planta de producción, y tomando en cuenta el perfil profesional necesario en cada uno de los procesos involucrados, es que se determinan los cargos a disponer para realizar la contratación de personal. En la Tabla 6.1 se detallan los cargos necesarios para cada sección de la planta.

Tabla 6.1: Cargos de trabajo por sección.

Sección	Cargo
Administración	Jefe de Planta
	Secretaria
Producción	Jefe de Producción
	Jefe de Turno
	Operario de Producción
	Operario de Purificación
Control de Calidad	Operario de Turno
	Supervisor de Calidad
	Analista Bioquímico
Investigación y Desarrollo	Jefe de Investigación
	Investigador
	Investigador Externo
Adicional	Personal de Aseo

6.2.2 Requerimientos de Personal

Dependiendo de las tareas que se deban realizar en cada sección de trabajo, será el número de personas que se contraten para dicha labor. En el caso de una planta de producción farmacéutica y de baja escala, utilizar las aproximaciones convencionales para determinar el número de operarios en función de las horas hombre y la producción diaria no se ajustan a la realidad; si tomamos como ejemplo el modelo para determinar las necesidades de personal propuesto por Wessel en 1952 (Zomosa, 1983) se obtiene lo siguiente:

Primero es necesario calcular el número de horas-hombre que se necesitan para llevar a cabo la producción requerida. La Ec. 43 corresponde al modelo para plantas pequeñas, de tipo batch. A pesar de que la operación del proceso es continua, la capacidad de la planta es demasiado pequeña como para utilizar otro modelo.

$$HH = 10,4 * P^{0,25} \quad (Ec. 43)$$

Donde:

HH: Horas-hombre por día y por etapa

P: Producción diaria de producto [Ton/d]

Considerando 4 etapas principales: Preparación de medios, Producción, Purificación y Formulación Final, y una capacidad de 2 g de producto por año, se obtiene un total de 0,089 [HH]. Luego el número de operarios se determina según la Ec. 44.

$$Nop = \frac{HH * N_E}{N_t * t} \quad (Ec. 44)$$

Obteniendo un total de 1 operario, lo cual no es posible de llevar a la práctica. Por lo que la determinación del número de operarios necesarios, fue pensada en función de la organización del trabajo y de las tareas que se deben realizar junto a la revisión de la información técnica y comercial de los principales equipos a utilizar en la línea de producción.

En la Tabla 6.2 se detalla el número de personas a contratar y los estudios que se ajustan al perfil necesario en cada uno de los cargos propuestos, especificando los requerimientos de personal a considerar al momento de abrir el proceso de postulación para la contratación de trabajadores.

Tabla 6.2: Estudios requeridos y número de puestos de trabajo por cargo.

Cargo	Estudios	Número de Personas
Jefe de Planta	Ingeniero Civil Bioquímico con MBA ¹	1
Secretaria	Secretariado Ejecutivo Gerencial	1
Jefe de Producción	Ingeniero Civil Bioquímico ²	1
Jefe de Turno	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos ³	3
Operario de Producción	Técnico Operador de Plantas Industriales	4
Operario de Purificación	Técnico Operador de Plantas Industriales	2
Operario de Turno	Técnico Operador de Plantas Industriales	2
Supervisor de Calidad	Técnico de Nivel Superior en Gestión y Control de Calidad	1
Analista Bioquímico	Bioquímico	1
Jefe de Investigación	Ingeniero Civil Bioquímico con Ph.D ⁴	1
Investigador	Químico Farmacéutico	1
Investigador	Bioquímico	1
Investigador Externo	Depende de la investigación que se desarrolle	1
Personal de Aseo	Personal de Aseo	1

¹ MBA o postgrado en ciencias de la administración y finanzas.

² Ingeniero Civil Bioquímico o equivalente a Ingeniero de Procesos especialista en procesos biológicos.

³ Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos o equivalente a Ingeniería con experiencia de trabajo en plantas de procesos.

⁴ Ingeniero Civil Bioquímico o carrera a fin a la investigación, con postgrado equivalente al grado de Doctor en Ciencias o Ciencias de la Ingeniería.

El número de jefes de turno y de operarios necesarios para la producción, queda justificado de acuerdo a las exigencias del Código del Trabajo según la normativa vigente y de acuerdo a la planificación de las tareas que deben realizarse, explicadas en las Secciones 6.2.4 y 6.3 respectivamente. En la Sección 6.3.2 se muestra el Diagrama de Gantt y en la Sección 6.3.3 la Malla de Pert que exponen el orden y la importancia de las tareas que deben ser realizadas.

6.2.3 Jerarquía de Cargos

De acuerdo al modelo de organización funcional que se propone para organizar la planta, se supone una jerarquía en función del cargo del trabajador dentro de la industria, acorde a las responsabilidades asociadas a las tareas que le corresponde realizar.

En la Figura 6.2 se muestra la organización jerárquica de la planta, en forma de organigrama.

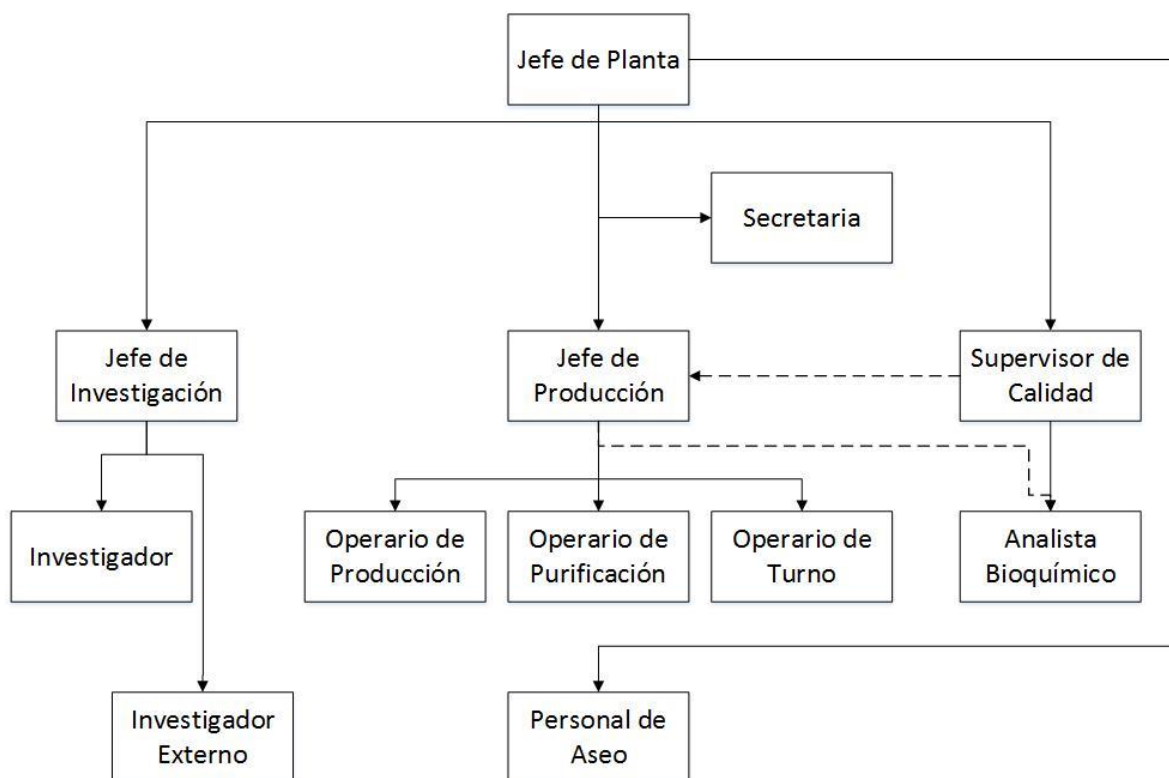


Figura 6.2: Organigrama jerárquico de la planta.

6.2.4 Jornadas de Trabajo

En el D.F.L. N°1 de 2002, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del Código del Trabajo, en el Artículo 22 del Párrafo 1° del mismo, se fija la jornada ordinaria de trabajo con un máximo de cuarenta y cinco horas semanales, que según el Artículo 28 deberán distribuirse en un mínimo de 5 días y en un máximo de 6 días, con un límite de hasta 10 horas de trabajo en un mismo día. En el inciso segundo del Artículo 22, se excluyen de esta jornada a los gerentes, administradores y todos aquellos que trabajen sin fiscalización superior inmediata, a menos que sea acordada en el contrato de trabajo (Dirección del Trabajo: Gobierno de Chile, 2013).

Para la producción de *rhBMP-2* se necesita operar la planta de forma continua, las 24 horas del día, sin embargo, la planificación del trabajo hace posible la coordinación de turnos de trabajo sobre tareas específicas que requieren de atención continua y otras que pueden ajustarse a un turno diario. De esta forma, dadas las características de producción de la planta se levantará solicitud a la

Dirección del Trabajo para ser considerados bajo el Artículo 38 del inciso 2° y así ser excluidos del descanso dominical.

De esta forma la Jornada Laboral de los trabajadores de la empresa se dividirá de la forma expresada en la Tabla 6.3 que se muestra a continuación:

Tabla 6.3: Clase de horario para cada cargo de la empresa.

Cargo	Clase de Horario
Jefe de Planta	Oficina
Secretaria	Oficina
Jefe de Producción	Oficina
Jefe de Turno	Turno
Operario de Producción	Turno
Operario de Purificación	Turno
Operario de Turno	Turno
Supervisor de Calidad	Oficina
Analista Bioquímico	Oficina
Jefe de Investigación	Oficina
Investigador	Oficina
Investigador Externo	A convenir
Personal de Aseo	Turno

Donde el horario de oficina corresponde de lunes a viernes de 8:00 a 18:00 [h], con una hora de colación, mientras que el horario por turnos se dividirá según el cargo desempeñado como se muestra en la Tabla 6.4:

Tabla 6.4: Horario de trabajo para las modalidades de turnos.

Cargo	Días	Horario
Jefe de Turno	Lunes a Jueves	7:00 - 16:00
		14:00 - 23:00
	Viernes a Domingo	9:00 - 18:00
		15:00 - 00:00
Operario de Producción	Lunes a Domingo	7:00 - 19:00
Operario de Purificación	Lunes a Domingo	12:00 - 0:00
Operario de Turno	Lunes a Domingo	19:00 - 7:00

El turno de mañana tendrá como tarea principal llevar a cabo las tareas de producción, el turno de tarde las tareas de recuperación y purificación y el turno nocturno se encargará principalmente de vigilar el funcionamiento de la planta, de acuerdo a las tareas expuestas en la Sección 6.3.2 en el Diagrama de Gantt. No obstante, todos los operarios podrán realizar otras tareas según disponibilidad y exigencia del jefe de turno quien deberá justificar los cambios ante el jefe de producción.

Para los jefes de turno, se dividen en dos turnos por día que contempla el contacto con los operarios de los tres turnos, sin embargo el turno nocturno tendrá una cierta cantidad de horas que no estará bajo vigilancia del jefe de turno, por lo que los operarios deberán rendir cuenta e informar de cualquier suceso ocurrido durante la noche al jefe de turno que entre a la mañana siguiente.

Dado que el Artículo 34 del Párrafo 3° del Código del Trabajo no considera el descanso dentro de la jornada como parte de la jornada diaria, los operarios tendrán un horario de colación de dos horas cumpliendo así lo exigido en el Artículo 28.

Cabe destacar que el sistema se dará en turnos rotativos, por lo que todos los operarios de la planta tendrán una capacitación sobre cómo operar la planta completa, ya que estarán eventualmente en los tres turnos posibles.

6.3 ORGANIZACIÓN DE LAS TAREAS DE PRODUCCIÓN

La producción se ha planificado en base a la secuencia y tiempo de las operaciones involucradas en el proceso, considerando la realización de un máximo de 6 lotes anuales. Se estima que de los 365 días del año sólo 335 serán trabajados, aunque en la práctica los días de trabajo podrían ser menos.

6.3.1 Plan de Producción

De acuerdo a la demanda de *rhBMP-2* proyectada por año (ver Capítulo 2), se estima la producción de la planta para cada período del proyecto, definiendo el número de lotes necesarios a realizar y en qué día del último lote del año se debe terminar el cultivo considerando que cada lote tiene una duración máxima de 54 días según lo diseñado. Esta información se muestra en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5: Estimación del número de lotes a producir de acuerdo a la demanda proyectada.

Año	Demanda de rhBMP-2 [mg]	N° de Lotes a producir	Día de detención del último cultivo
2013	-	-	-
2014	1368,78	5,00	54
2015	1387,35	5,07	7
2016	1405,94	5,14	10
2017	1424,55	5,20	14
2018	1443,18	5,27	17
2019	1461,83	5,34	21
2020	1480,49	5,41	24
2021	1499,17	5,48	28
2022	1517,87	5,55	31
2023	1536,58	5,61	35

La realización de un lote de producción, contempla una etapa de propagación (realizada antes del término del lote anterior), un cultivo por lotes de tres días de duración y el cultivo en perfusión que tendrá una duración de 51 días, con excepción del último en el que se ajustará de acuerdo a lo expuesto en la Tabla 6.5 (para los años 2014, 2015, 2016 y 2017 se extenderá el quinto lote en los días que corresponde en vez de iniciar un cultivo nuevo).

El cultivo en perfusión una vez iniciado, será llevado a condiciones de hipotermia suave al onceavo día de producción y se espera que dos días después se alcance el estado estacionario. Sólo una vez alcanzado este estado se comenzará la etapa de recuperación y purificación de la proteína. Todo el proceso de recuperación y purificación descrito en los Capítulos 4 y 5, se realizarán una vez al día.

6.3.2 Planificación de Tareas: Diagrama de Gantt

Un diagrama (o carta) de Gantt es un cronograma de las actividades principales de un proyecto, de principio a fin, con la duración de cada una de ellas.

Sus principales ventajas radican en su interfaz, que al ser muy simple resulta atractiva y fácil de entender para el resto de las personas, y permite a su vez revisar el avance de lo proyectado (Wilson, 2003). Su desventaja es que no muestra interdependencia entre las actividades y no indica cuáles actividades pueden retrasarse sin influir en el término programado del proyecto.

Para determinar las actividades correspondientes a este proyecto de ingeniería, se ha decidido planificar usando como base, un lote de producción para marcar el inicio y el final del cronograma. La escala de tiempo utilizada para un lote de aproximadamente 2 meses de duración, no puede ser menor que días, por razones de espacio; por lo que la duración de las tareas no se logra apreciar en su totalidad, sino que simplemente se indica el día en que debe ser realizada la tarea.

La preparación y esterilización del medio de cultivo se realiza cada 4 días, ya que antes de ingresar al reactor debe ser sometida a pruebas para descartar que se haya contaminado; los resultados de los análisis demoran alrededor de dos días en ser entregados, por lo que planificando la preparación cada cuatro días es posible tener un período de desfase en caso de que exista contaminación.

Finalmente, cabe señalar que existen tareas cíclicas a lo largo del proyecto, tales como el sistema de purificación. Al analizar la Figura 6.3, da la impresión de que la recuperación y purificación del producto fuera continua, sin embargo son operaciones por lotes que se realizan periódicamente con espacios de un día. A continuación se presenta el diagrama de Gantt del proceso:

6.3.3 Detección de Rutas Críticas: Malla Pert

La Malla Pert es utilizada como una herramienta cuantitativa de planificación y control, lo que permite a los administradores contar con un modelo de optimización que entregue la solución óptima de una secuencia de actividades en el tiempo, que deben realizarse para finalizar el plan de acción. También permite al administrador programar un proyecto por adelantado y a la vez calcular el tiempo necesario para completarlo. Como herramienta de control, la Malla Pert facilita las actividades de control, permitiendo la comparación del tiempo real con el planificado.

En una Malla Pert deben estar anotadas todas las actividades del proyecto, relacionadas entre ellas, mostrando las que son paralelas en su ejercicio y señalando duración y encargado.

Las principales ventajas de la Malla Pert son que define explícitamente y vuelve visibles las dependencias entre las actividades del proyecto, facilita la identificación de rutas críticas que pudieran retrasar la finalización del proyecto permitiendo identificar cuáles son las actividades que pueden ser reprogramadas o pueden ser modificadas sin alterar el proyecto (Malcom, Roseboom, Clark, & Fazar, 1959).

La malla Pert que se presenta en la Figura 6.4, es un esquema donde se muestran sólo las actividades claves del proceso que se enlistan a continuación en la Tabla 6.6, con sus respectivos tiempos de duración indicados sobre cada circunferencia donde el primer número indica el día de inicio y el segundo indica el día de término de la actividad.

Tabla 6.6: Lista de actividades para creación de malla PERT.

Nomenclatura PERT	Actividad
A	Recepción de materias primas, aditivos e insumos.
B	Preparación de material de propagación.
C	Preparación de medio de propagación.
D	Esterilización de medio de propagación.
E	Propagación.
F	Preparación del reactor.
G	Preparación de medio de producción.
H	Esterilización de medio de producción.
I	Etapas de cultivo por lote.
J	Etapas de cultivo continuo en perfusión transiente.
K	Etapas de cultivo continuo en perfusión estacionaria.
L	Recolección.
M	Ultrafiltración.
N	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.
O	Diafiltración
P	Cromatografía de Exclusión Molecular
Q	Formulación final.

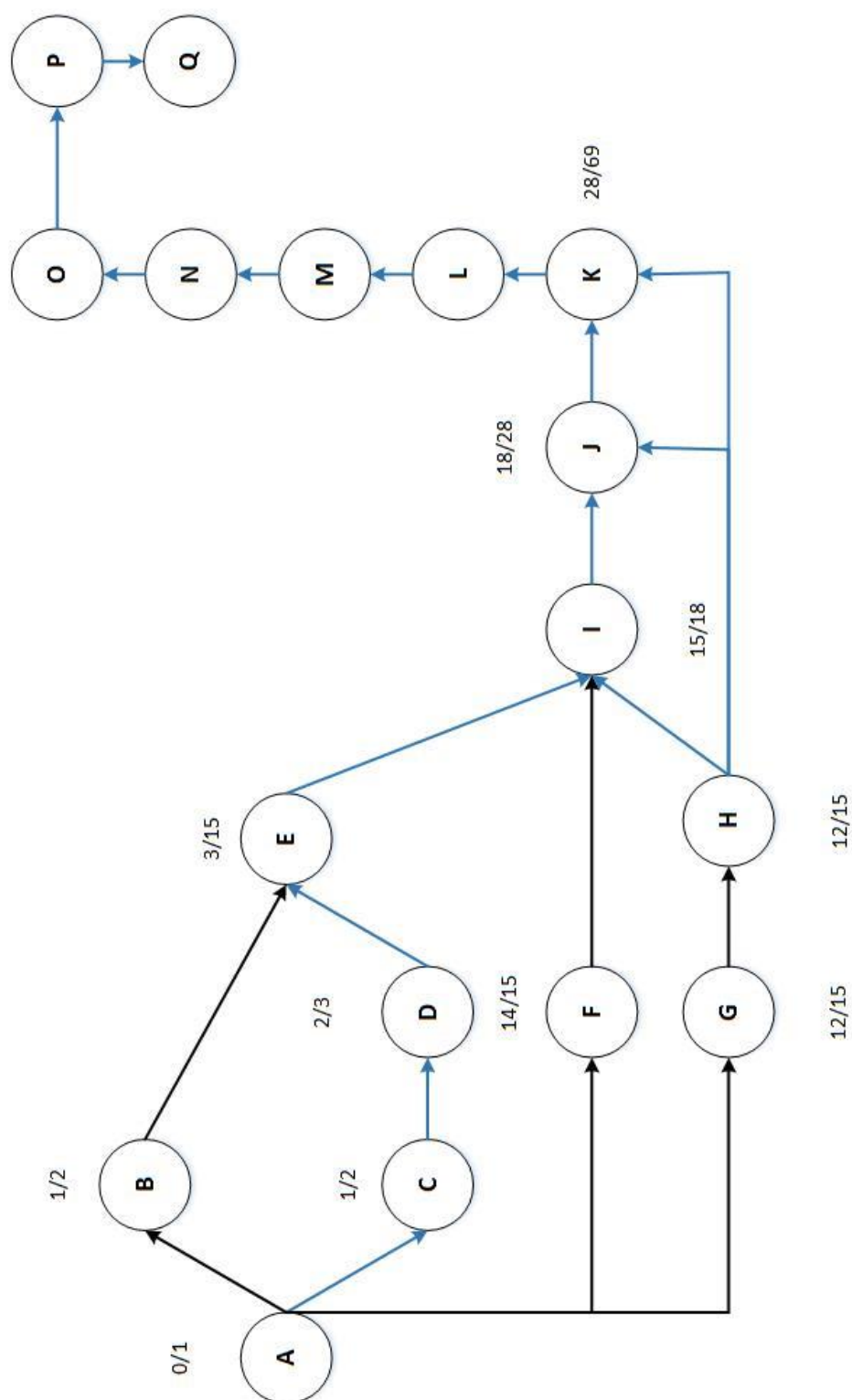


Figura 6.4: Malla PERT del proceso.

6.4 ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA

Al tratarse de una empresa del rubro farmacéutico, existen normas especiales a considerar sobre el cómo debe operarse y las características del recinto para lograr una manufacturación adecuada. El diseño de la planta requiere de un riguroso aislamiento de los distintos recintos y el área productiva debe contar con la máxima seguridad desde el punto de vista de limpieza, permitiendo un flujo seguro y restringido.

El área administrativa y de servicios higiénicos no debe estar conectada al área productiva. No puede haber contacto con personas que no estén correctamente equipados para cumplir con las normas de esterilidad y asepsia.

6.4.1 Requisitos de Instalaciones para la Industria Farmacéutica

Para determinar los requisitos de instalaciones (pensando en comercializar en el extranjero) es necesario guiarse por los estándares de calidad internacional propuestos por entidades reconocidas con el fin de asegurar la calidad del producto.

Estos estándares se encuentran publicados en documentos que detallan las buenas prácticas de manufactura tales como “Guide to Good Manufacturing Practice in the European Community” (European Commission: Enterprise and Industry Directorate-General, 2008) o las publicaciones de la FDA: “Points to Consider” (Office of Biologics Research and Review: Center for Drugs and Biologics, 1985), disponibles en línea.

De esta forma el diseño de las instalaciones será realizando tomando en cuenta la información publicada en estos documentos.

6.4.2 Diseño de Instalaciones

La sección de administración general contará con una recepción, que consiste en un pasillo de acceso y un escritorio para la secretaria, además de tener 2 oficinas disponibles: una para el jefe de planta y una oficina para el jefe de producción.

Los baños y camarines para el personal tendrán acceso por el pasillo a un costado de la recepción. Los trabajadores del área de producción que deseen utilizar las instalaciones deberán pasar por

camarines de forma obligatoria para colocarse una vestimenta adecuada previamente esterilizada, con el fin de evitar contaminaciones.

La zona de producción contará con múltiples recintos cerrados que separarán las fases del proceso, con el fin de garantizar la independencia entre etapas, y aumentar el control sobre cada una de ellas.

Las salas con las que contará finalmente la planta serán:

- Hall de acceso y recepción.
- Oficina jefe de planta.
- Oficina jefe de producción.
- Baños y camarines separados por género.
- Pasillo de evacuación.
- Sala de recreación y descanso.
- Laboratorio de control de calidad.
- Laboratorio de investigación y desarrollo.
- Sala de lavado de materiales.
- Sala de cultivo celular para la propagación de los cultivos.
- Sala de producción.
- Sala de purificación.
- Sala de preparación de materiales.
- Sala de esterilización de material.
- Sala de almacenamiento de material.
- Sala de almacenamiento de producto.
- Sala de formulación final.
- Sala de preparación de soluciones.

6.4.3 Distribución Física del Proceso en la Planta: “Process Layout”

Para distribuir físicamente los equipos y materiales en las instalaciones de la planta, es necesario considerar que los objetivos que se buscan son minimizar el movimiento y manipulación del material, evitar puntos de congestión o cuellos de botella en el proceso, minimizar la circulación de las personas dentro de las instalaciones, flexibilizar las instalaciones frente a un eventual cambio o ampliación en el proceso y otorgar condiciones de operación seguras tanto para las personas como para el medio ambiente.

El tamaño de las instalaciones debe ser considerado de acuerdo al espacio utilizado por los equipos que se dispondrán, de modo que el área de procesos será determinada en base a la estimación de que el área de los equipos equivale a un 5% del área destinada a la sección de procesos.

Esta estimación se basa en que cada una de las etapas de producción será realizada en espacios físicos diferentes, además de que al ser una planta de producción a baja escala, la capacidad de los equipos claramente es inferior a la de otra industria, con lo que representaría una porción menor

del espacio que en otros casos. Las demás instalaciones fueron estimadas según criterio para desarrollar las actividades correspondientes y los estacionamientos según normativa legal vigente.

En la Tabla 6.7 se entregan las dimensiones de los equipos principales del área de procesos, y en la Tabla 6.8 se entrega el detalle del área necesaria para cada una de las instalaciones.

Cabe destacar que los valores de la Tabla 6.8 son aproximados y deben ser adecuados al plano de arquitectura de la planta según corresponda para la empresa que decida comprar el proyecto, ya que solo son una referencia; posteriormente en la sección 6.4.4 será contrastada con una propuesta para la construcción de una planta de producción farmacéutica.

Tabla 6.7: Dimensiones y área en suelo de equipos de procesos.

Equipo	Ancho (W)	Prof. (D)	Area [m ²]
W-1	45	58	0,261
W-2	45	58	0,261
E-1	46	46	0,2116
E-2	66	66	0,4356
E-3	58	58	0,3364
E-4	58	58	0,3364
E-5	126	86	1,0836
E-6	126	86	1,0836
E-7	86	66	0,5676
M-1	8,4	8,4	0,007056
M-2	8,4	8,4	0,007056
R-1	32	56,5	0,1808
UF-1	11,4	14	0,01596
UF-2	11,4	14	0,01596
C-1 y C-2	75	54	0,405
Total Equipos			5,2

Tabla 6.8: Dimensión total de las instalaciones de la planta.

Instalación	Área [m ²]
Planta de Procesos	100
Oficinas	25
Servicios	40
Estacionamientos	60
Laboratorios	60
Almacenamiento	25
Recepción de Camiones	100

6.4.4 Propuesta de Diseño para la Construcción de la Planta de Producción

Primero que todo es necesario señalar la imposibilidad de construir una planta de producción exclusiva para un producto farmacéutico, por lo que el diseño de la planta debe considerar la utilización de las instalaciones para otras líneas de producción o bien considerar terrenos disponibles para la ampliación de la planta.

Además se deben incluir la totalidad de instalaciones necesarias para proporcionar un buen ambiente de trabajo, considerando pasillos de evacuación, salas de descanso, camarines y baños, áreas verdes, lugar físico para almorzar, entre otras cosas.

La propuesta que se presenta a continuación considera un terreno mínimo total de 6000 [m²] (aproximadamente un terreno cuadrado de lado 77 [m]), para la construcción de todas las etapas de la planta. Las áreas verdes no se consideran, ya que depende de la aceptación de la empresa que compre el proyecto, ya que puede considerar la construcción de algunas etapas y otras no (acorde a sus necesidades), por lo que quedan pendientes de diseño.

En la Tabla 6.9 se entrega el detalle del área necesaria para cada una de las instalaciones, que si bien se aproximan a las estimaciones presentadas en la Tabla 6.8, se corrigen de acuerdo al diseño presentado y en algunos casos considera un área mucho mayor ya que las estimaciones anteriores son las necesarias para desarrollar el proyecto, sin embargo la planta que se diseña tendrá una capacidad mayor de acuerdo a lo argumentado anteriormente.

Tabla 6.9: Dimensión total de las instalaciones de la planta de producción (Etapa 1).

Instalación	Área [m ²]
Planta de Procesos	148
Oficinas	21
Sala de Reuniones	21
Servicios	72
Estacionamientos	62,5
Laboratorios	63
Almacenamiento	58
Recepción de Camiones	346,92/272,67

Se presentan a continuación 8 planos como imagen que se encuentran en la contraportada a una escala mayor para facilitar su análisis, y una copia digital en el CD anexo. Los planos que se presentan se encuentran acotados en centímetros.

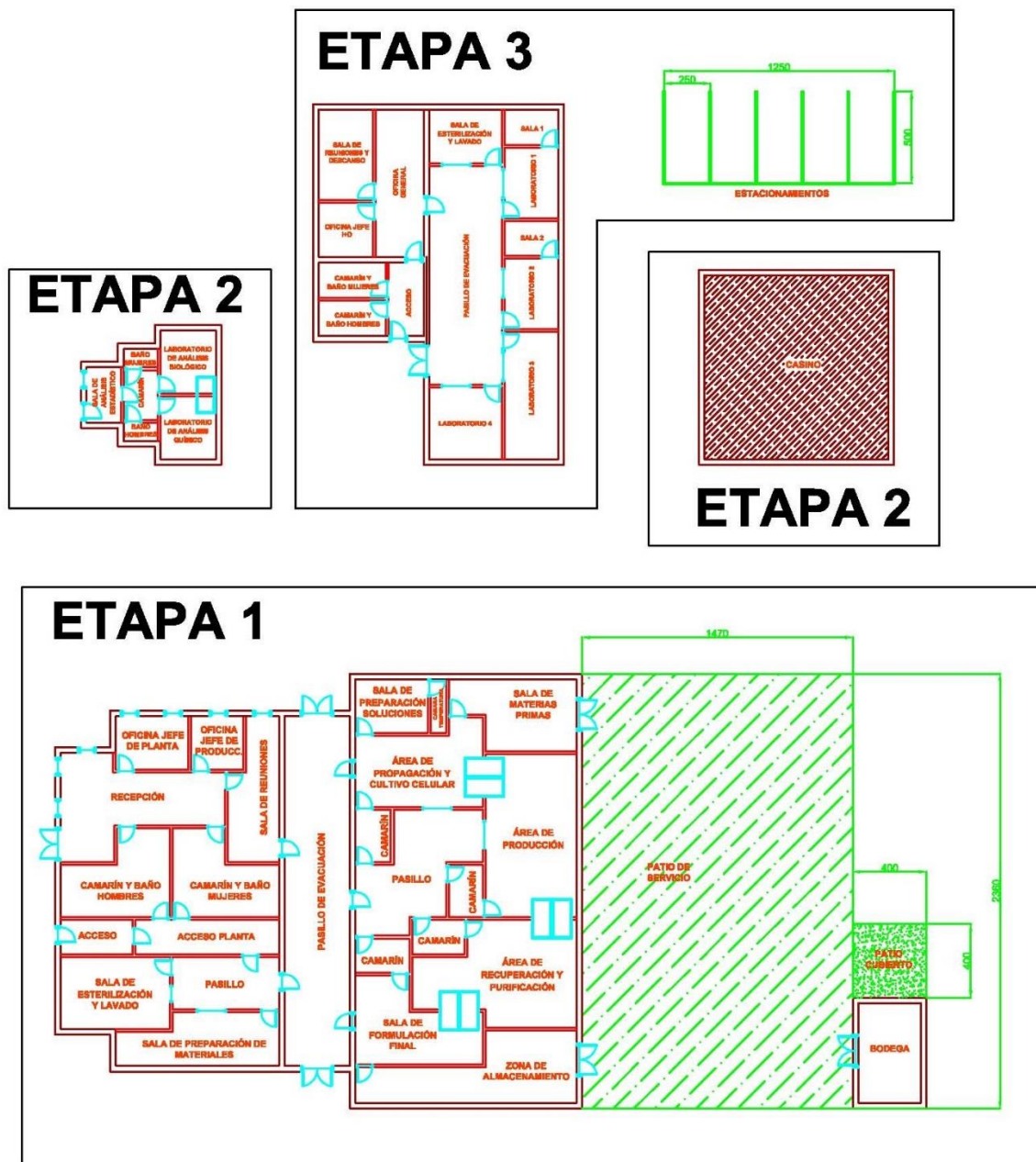


Figura 6.5: Plano general con etapas de construcción. La etapa 1 corresponde al edificio de producción, la etapa 2 al edificio de control de calidad y al edificio utilizado como casino y la etapa 3 al edificio de investigación y desarrollo y estacionamientos.

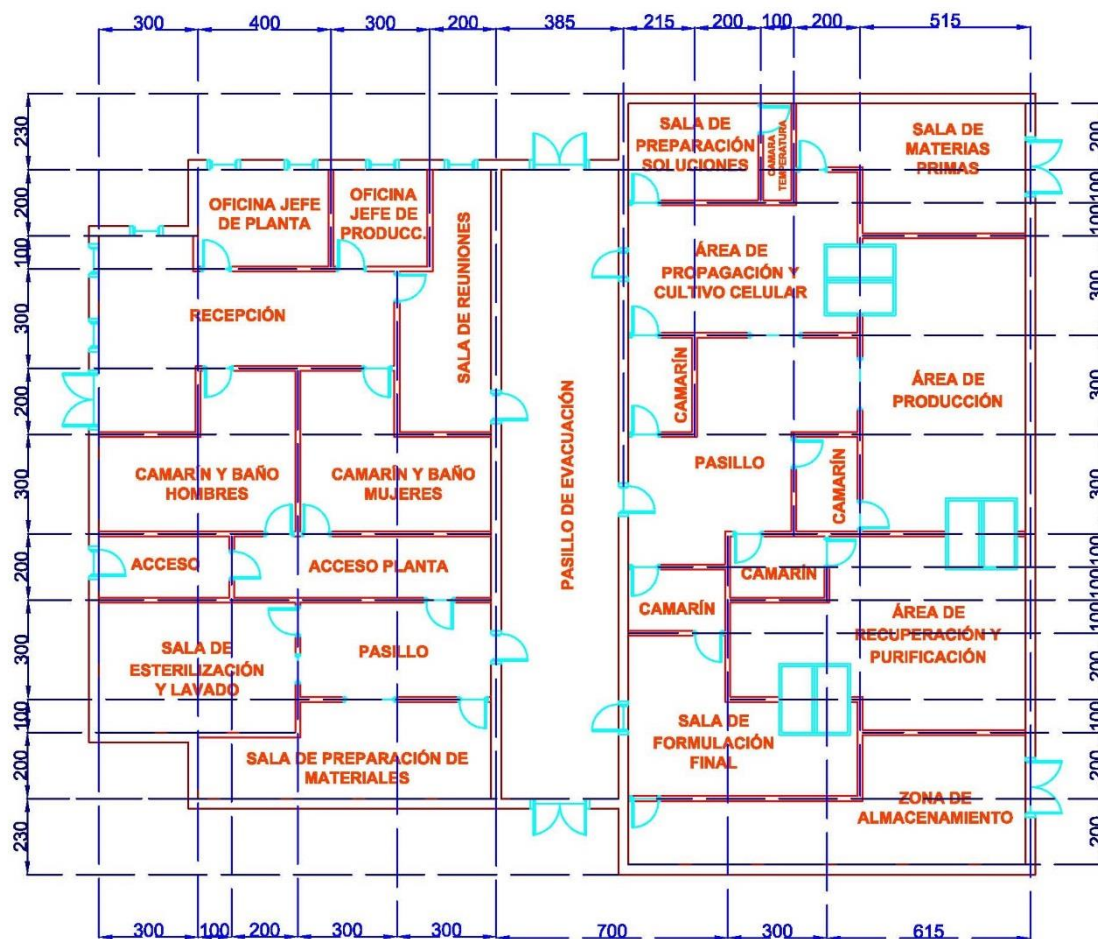


Figura 6.6: Plano de Arquitectura del edificio de producción.

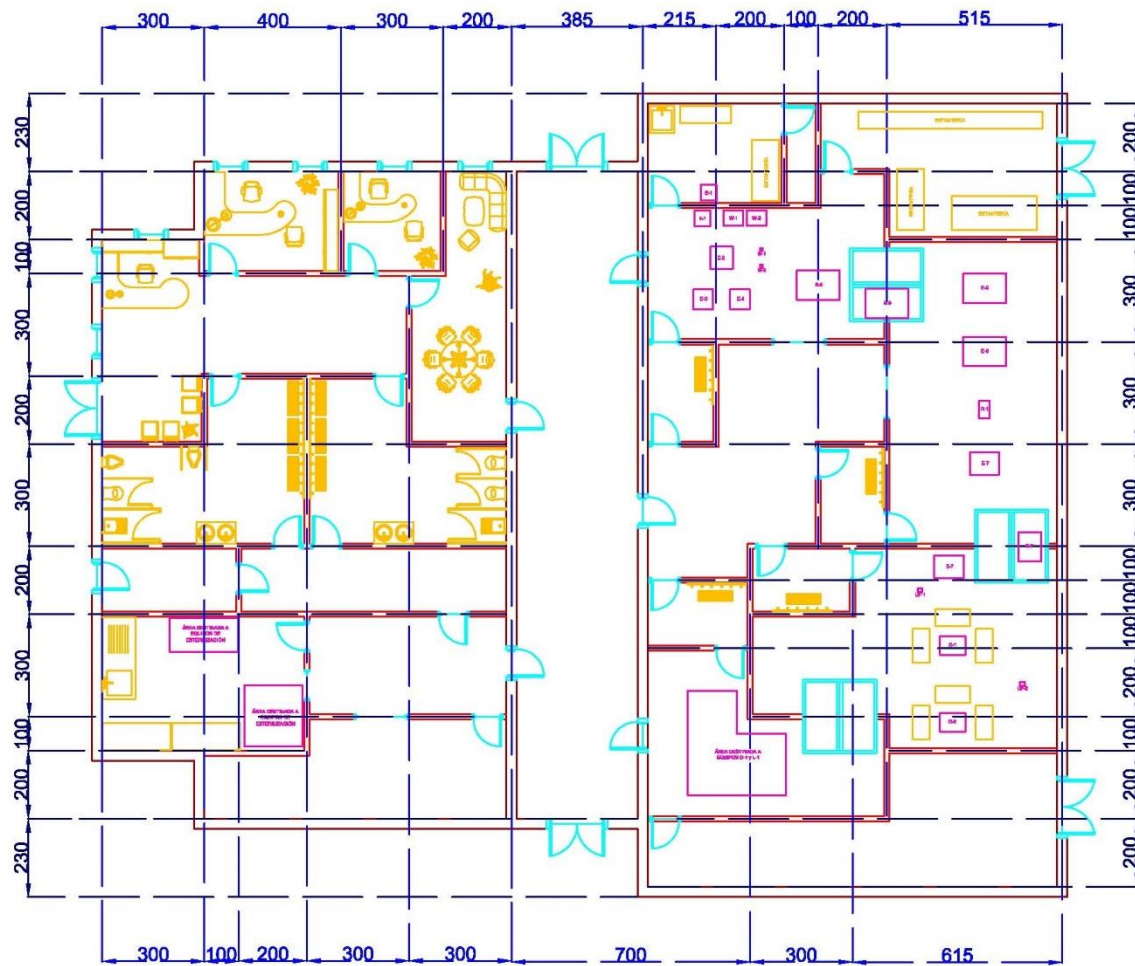


Figura 6.7: Plano de Distribución de equipamiento y equipos de procesos en planta (Layout).

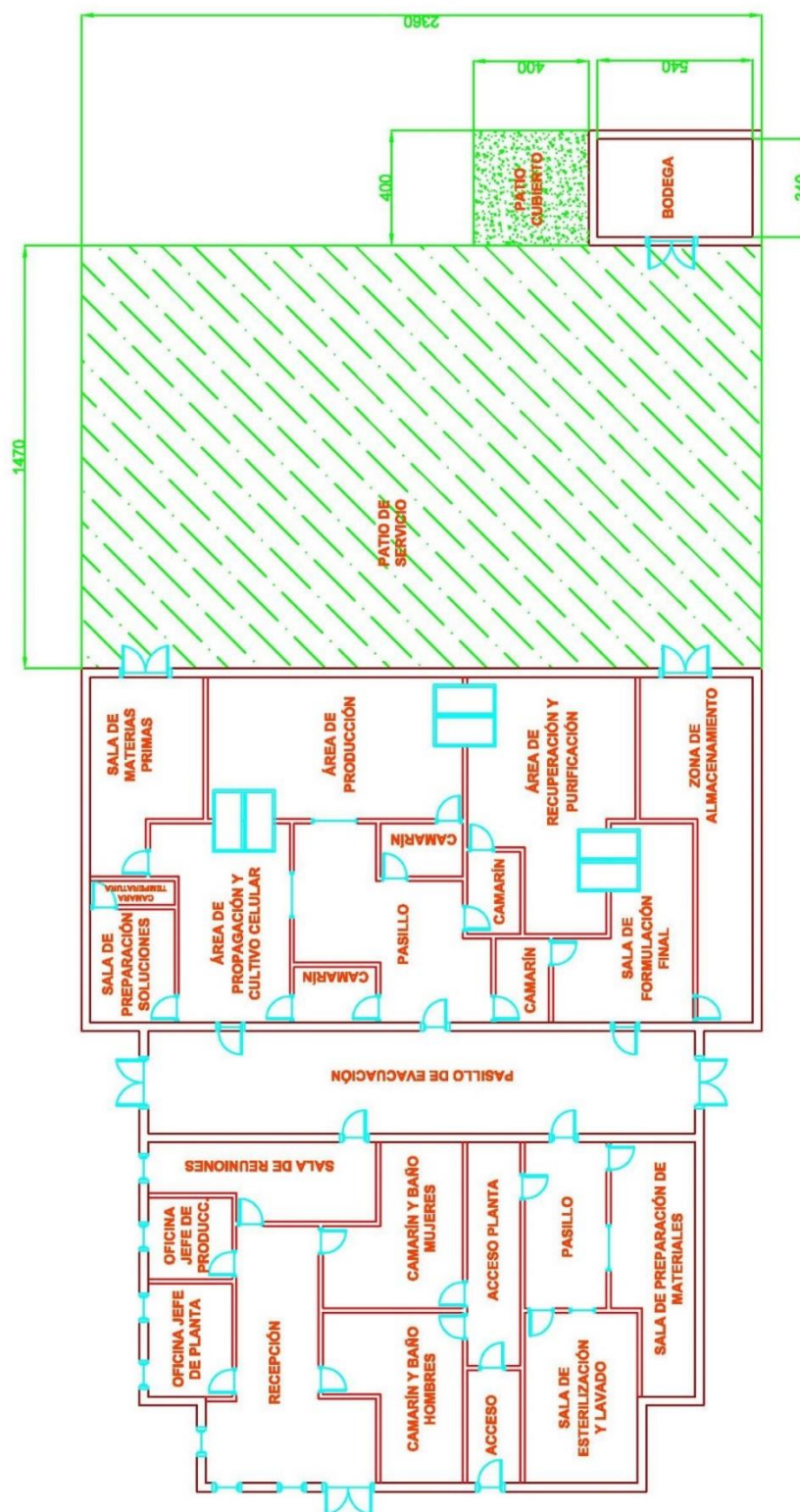


Figura 6.8: Áreas de Servicio asociadas al edificio de producción.

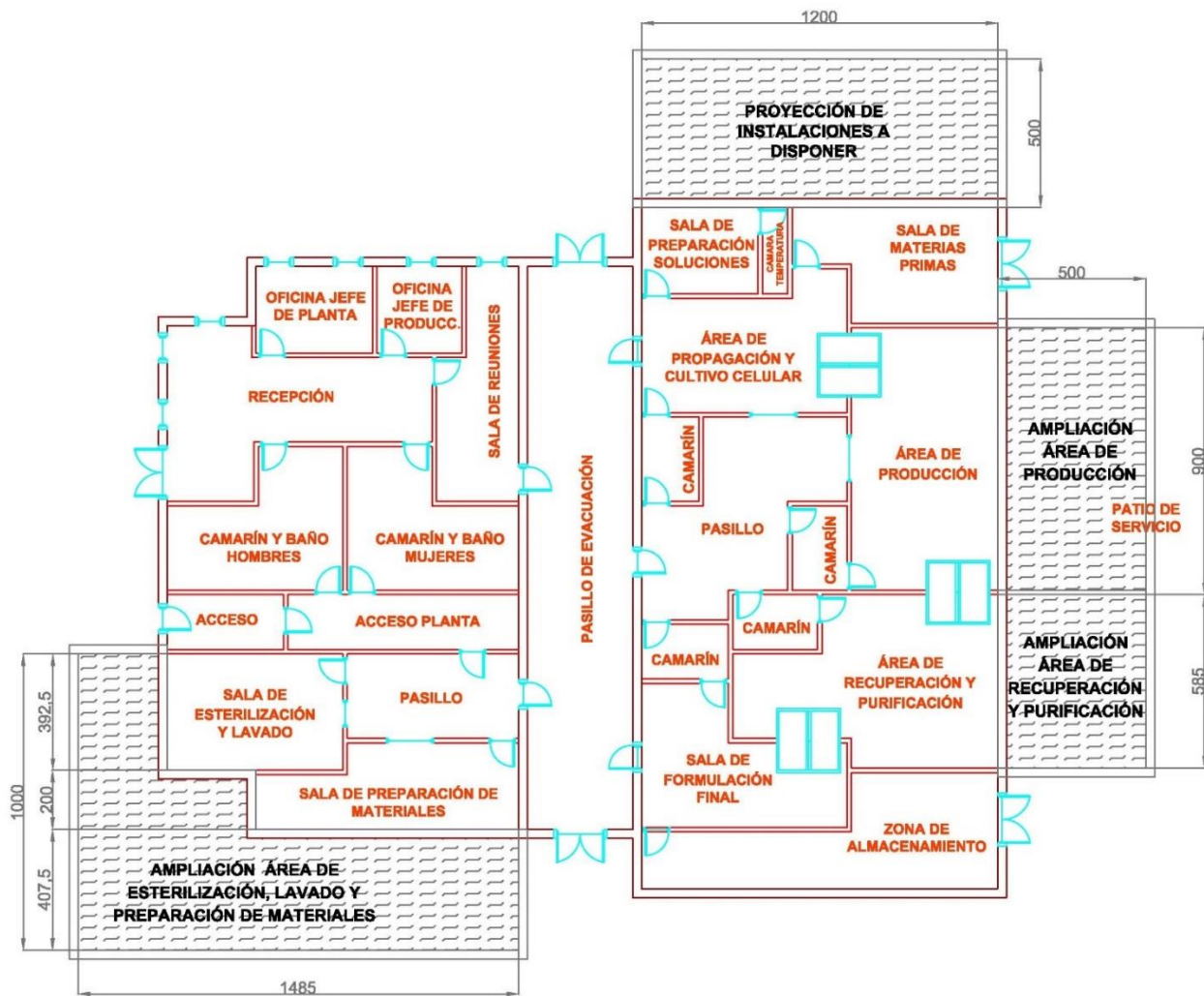


Figura 6.9: Áreas disponibles para ampliación de la planta de producción.

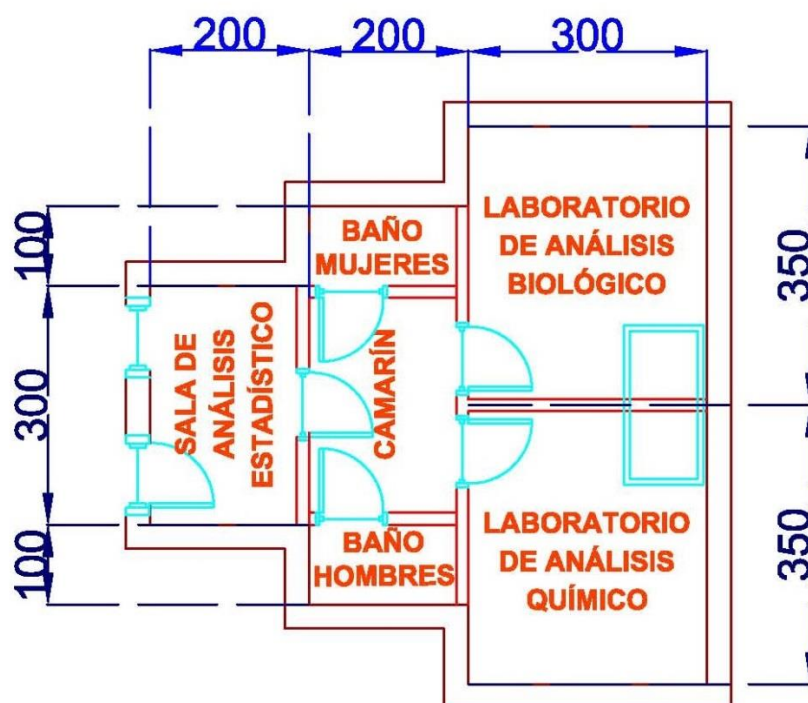


Figura 6.10: Edificio de Control de Calidad.

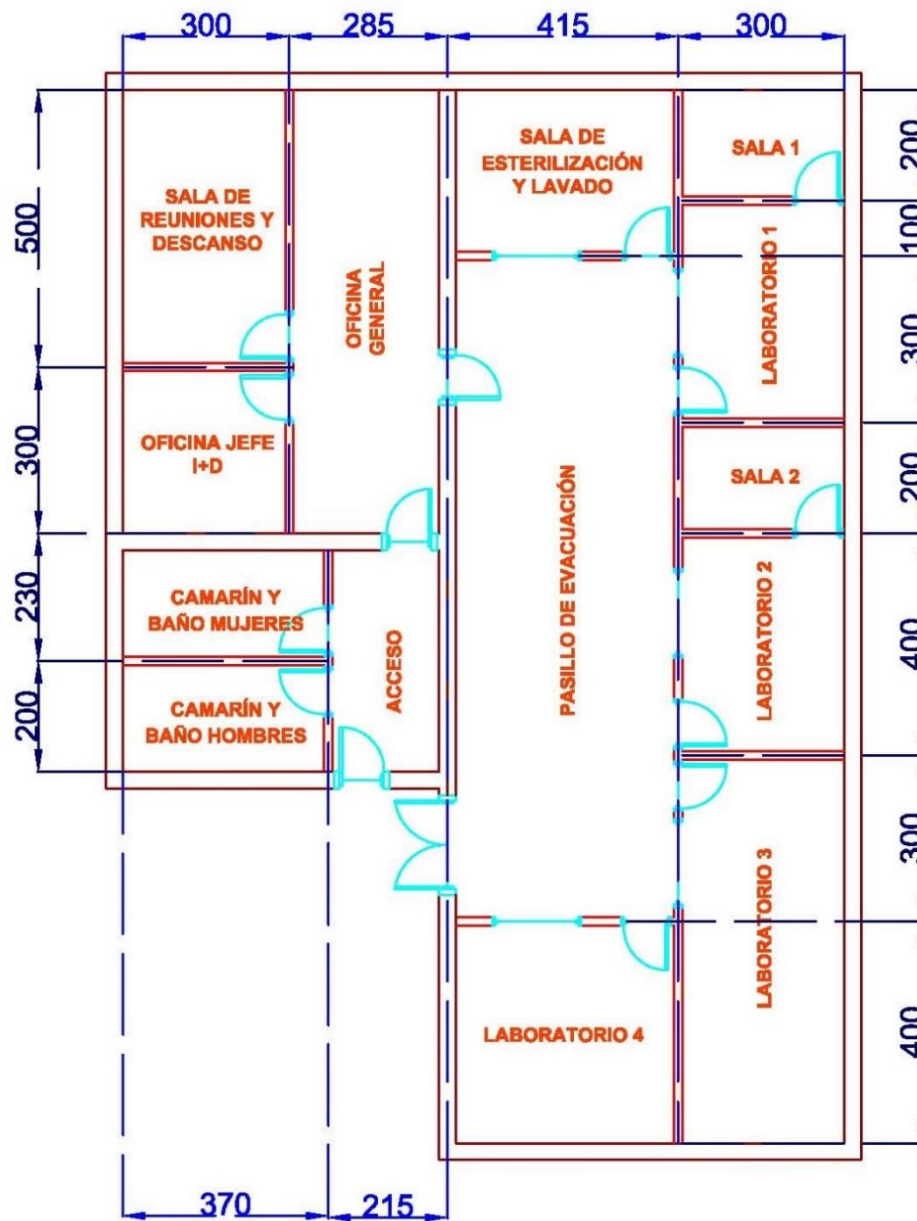


Figura 6.11: Edificio de Investigación y Desarrollo.

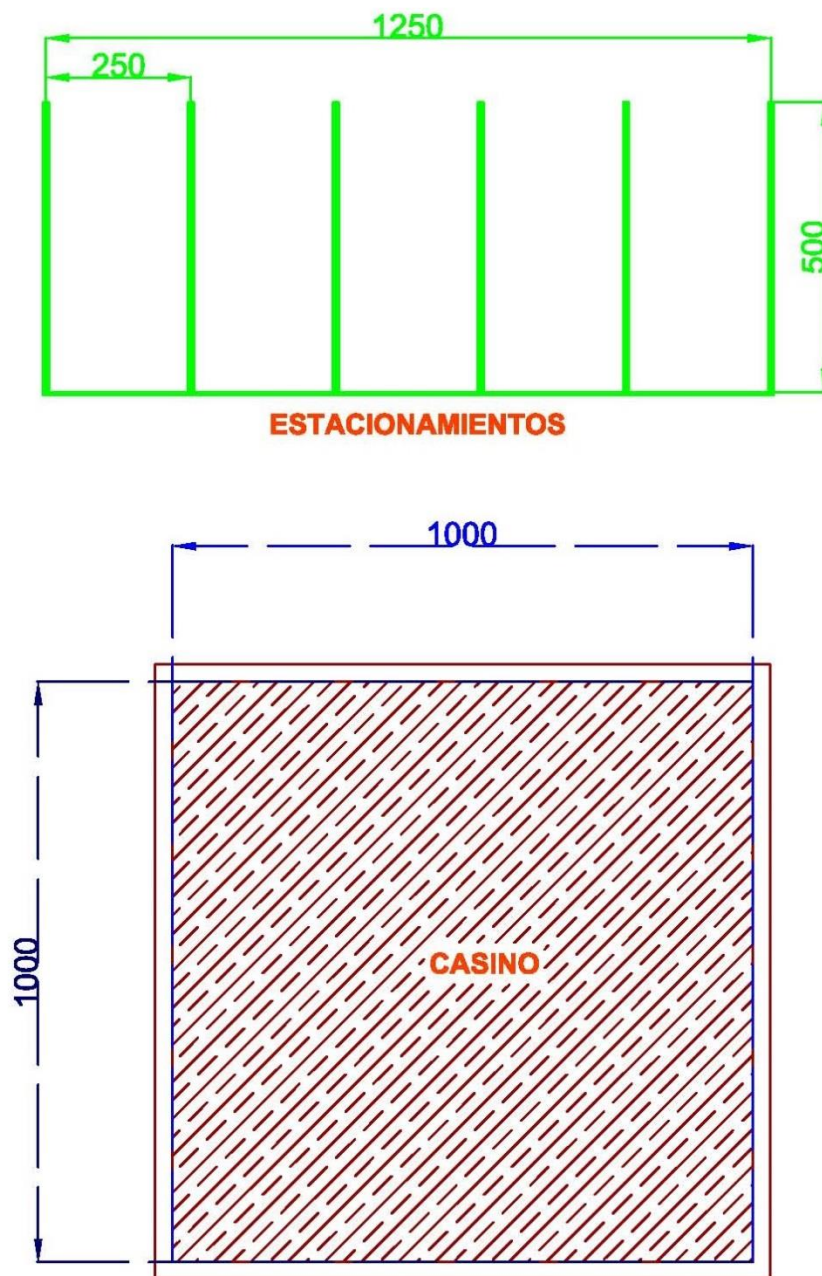


Figura 6.12: Casino y estacionamientos.

Se planifica la construcción de la planta completa en 3 etapas distintas asociadas a los 3 edificios de importancia correspondientes a producción, control de calidad e investigación y desarrollo, como se muestra en la Figura 6.5. Esto se hace con el objetivo de flexibilizar el diseño de la planta para que pueda adaptarse fácilmente a las necesidades de la empresa que compre el proyecto.

En la Figura 6.6 se muestran las dimensiones del edificio de producción.

En la Figura 6.7 se muestra la distribución de los equipos en planta, correspondientes a los equipos especificados en el Capítulo 5. Es necesario señalar que los estanques E-5 y E-7 se encuentran triplicados en el plano, esto es debido a que estos estanques se mueven de una sala a otra a través del comunicador, por lo que el espacio que utilizan debe ser considerado en ambas salas y al interior del comunicador.

En la Figura 6.8 se muestran los patios de servicio (recepción de camiones y patio cubierto) y bodega; mientras que en la Figura 6.9 se muestran los terrenos disponibles para realizar ampliaciones de la planta. En la Tabla 6.9 el ítem de recepción de camiones es variable; 346,92 [m²] corresponde al área sin ampliación de la planta, mientras que 272,67 [m²] correspondería al área luego de construir las ampliaciones.

Las Figuras 6.10, 6.11 y 6.12 muestran un plano de arquitectura de las demás dependencias, que no son desarrolladas mayormente, ya que depende de quién implemente el proyecto si son incluidas o no, por lo que solo se sugiere un diseño preliminar de las salas que debieran contener.

6.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 6

- Chiavenato, I. (2007). *Introducción a la Teoría General de la Administración* (Séptima ed.). Mexico: McGraw-Hill.
- Dirección del Trabajo: Gobierno de Chile. (Diciembre de 2013). Código del Trabajo. Santiago, Chile.
- European Commission: Enterprise and Industry Directorate-General. (25 de Noviembre de 2008). *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*. Recuperado el 02 de Enero de 2014, de EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. - European Commission: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf
- Hellriegel, D., & Slocum, J. (2004). *Comportamiento Organizacional*. Thomson.
- Malcom, D., Roseboom, J., Clark, C., & Fazar, W. (1959). Application of a Technique for Research and Development Program Evaluation. *Operations Research*, 7(5), 646-669.
- Office of Biologics Research and Review: Center for Drugs and Biologics. (10 de Abril de 1985). *Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology*. Recuperado el 02 de Enero de 2014, de [www.fda.gov](http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/otherrecommendationsformanufacturers/ucm062750.pdf): <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/otherrecommendationsformanufacturers/ucm062750.pdf>
- Wilson, J. M. (2003). Gantt Charts: A Centenary Appreciation. *European Journal of Operational Research*, 149, 430-437.
- Zomosa, A. (1983). *Manual de proyectos de ingeniería química*. Santiago: Universidad de Chile.

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN ECONÓMICA

Este capítulo tiene como objetivo ordenar y sintetizar la información monetaria para elaborar un análisis financiero que permita evaluar la rentabilidad del proyecto que se presenta en los capítulos anteriores (Sapag & Sapag, 1991). En una primera instancia se sistematizará la información financiera, definiendo la inversión necesaria, los costos e ingresos; luego se completará la información a través de datos propios de este análisis financiero que permitan finalmente realizar la evaluación económica sobre el flujo de caja y determinar la rentabilidad del proyecto.

Es importante mencionar que la unidad monetaria utilizada en este capítulo será la unidad de fomento (UF), calculada en cada caso utilizando los indicadores económicos del día 6 de enero de 2014 presentados en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1: Indicadores económicos utilizados. (Banco Central de Chile, 2014)

Indicador Económico	Valor [CLP]
Unidad de Fomento (UF)	23.336,59
Dólar Estadounidense [USD]	528,80

Para desarrollar el análisis financiero, en primera instancia se definirá el capital de inversión, clasificados como capital fijo y capital de trabajo; luego se establecerán los costos de operación y venta del producto, organizados como costos de producción y gastos generales. Además se establecerá el ingreso anual en función de las ventas de *rhBMP-2* y finalmente se realizará la evaluación de la rentabilidad económica respecto al flujo de caja.

Por otra parte, para permitir una mejor evaluación final del proyecto se realizará un análisis de sensibilidad que permite incorporar algunos factores de riesgo y medir, en este caso, cuán sensible financieramente es el proyecto frente a variaciones en algunos parámetros; esto permite a la vez indicar la marginalidad del mismo e incorporar valores no cuantificados en la evaluación (Sapag & Sapag, 1991).

Antes de comenzar el análisis es importantes destacar que se descartan los pagos de licencia y royalty a la patente US 2013/0060012 A1, debido a que esta patente fue presentada bajo el acuerdo PCT (Tratado de Cooperación en materia de Patentes) (ver Apéndice D.1) el año 2010 y según los organismos de propiedad intelectual de los países de interés comercial (Bolivia, Ecuador, Perú, Argentina y Chile) esta patente no estaría registrada en dichos países (SENAPI, Bolivia, s.f.) (Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual, s.f.) (Indecopi, Perú, s.f.) (INPI, Argentina, s.f.) (INAPI, s.f.). Por otro lado, para los países suscritos al PCT, el plazo de 18 meses a partir de la presentación de la solicitud internacional para realizar el trámite de patente ha caducado, impidiendo proteger y patentar el proceso de purificación presentado. Además dentro del mercado objetivo, tanto Argentina como Bolivia no están suscritos al PCT, implicando que ni siquiera existe el plazo de 18 meses para estudiar la posibilidad de presentar la solicitud de patente en el país deseado. De esta manera, se puede observar que dadas las condiciones actuales no es necesario considerar el pago de licencia o royalty; lo que no significa que al comenzar a comercializar, la marca competidora pueda realizar una mejor sustantiva de dicho proceso y presentar una solicitud de patente nueva que pueda involucrar el proceso escogido en este proyecto, lo que significaría re-evaluar la situación de costos.

7.1 CAPITAL DE INVERSIÓN

Como se mencionaba, el capital de inversión se separa en capital fijo, destinado a suplir los gastos de las instalaciones de la planta y equipos de fabricación; y en el capital de trabajo, requerido para operar la planta en un inicio. A la vez, el capital fijo se subdivide en directo o de producción (equipos instalados, tuberías, instrumentación, preparación de terreno, etc.) e indirecto o no asociado a producción (edificación, oficinas administrativas, transporte y envío, etc.) (Peters & Timmerhaus, 1991).

7.1.1 Capital Fijo Directo (CFD)

Equipos instalados

Para el desarrollo del análisis financiero es necesario contar con el valor de los equipos considerando la entrega y finalmente la instalación de los mismos. Estos datos pueden ser estimados de acuerdo a porcentajes típicos del costo inicial de cada equipo; y este último se puede obtener por medio de tres métodos:

- (a) Cotización directa: El proveedor entrega el valor real del equipo según las características específicas del mismo. En este trabajo, mayoría de los equipos fueron cotizados de esa forma, a excepción de los estanques de acero de almacenamiento de agua (E-1 y E-2) y de mezclamiento de medio (E-3 y E-4).
- (b) Estimación por relaciones bibliográficas: Existen diferentes ecuaciones y gráficos que relacionan precios de diversos clases de los equipos más utilizados (Couper, Penney, Fair, & Wales, 2012), permitiendo estimar el costo, en este caso trabajado en FOB (sigla en inglés para franco a bordo) que corresponde a un acuerdo de comercio internacional.

En muchos casos, los datos de costo disponibles por este método corresponden otros años, y debido a que los precios pueden variar considerablemente, se pueden utilizar índices de costos que permitan actualizar dicho precio según la ecuación Ec. 45 (Peters & Timmerhaus, 1991).

$$C_P = C_O \cdot \left(\frac{I_P}{I_O} \right) \quad (Ec. 45)$$

Donde,

C_P : Costo del equipo en el presente

I_O : Valor del índice al año del cotos

C_O : Costo original

original

I_P : Valor del índice en el presente

- (c) Estimación por escalamiento: Cuando no se cuenta con el precio del equipo para el tamaño operacional de capacidad deseado, se puede realizar una buena estimación mediante una relación logarítmica conocida como la regla del factor seis décimos y expresada en la ecuación Ec. 46 (Peters & Timmerhaus, 1991). Es importante mencionar que esta regla corresponde a simplificación aproximada utilizada si no existe algún tipo de información adicional, pues el exponente de la ecuación puede variar desde 0,2 a valores mayores 1 (Peters & Timmerhaus, 1991).

$$C_A = C_B \cdot \left(\frac{Cap_A}{Cap_B} \right)^{0,6} \quad (Ec. 46)$$

Donde,

C_A : Costo del equipo A

C_B : Costo del equipo B

Cap_A : Capacidad del equipo A

Para conocer el valor del equipo entregado (CEE) e instalado (CEI) se utilizan las ecuaciones Ec. 47 y Ec. 48 respectivamente; asumiendo que el costo de entrega del equipo corresponde al 10% del valor del mismo (C), mientras que el factor de instalación (F_i) depende el tipo de equipo.

$$CEE = C \cdot (1 + 0,1) \quad (Ec. 47)$$

$$CEI = C \cdot F_i \quad (Ec. 48)$$

Como se menciona al inicio, la mayoría de los equipos pudo ser cotizado de forma directa y en el caso de los equipos cuyo valor no pudo ser obtenido de esa forma (estanques E-1, E-2, E-3 y E-4), se estimó el valor FOB tal como se plantea en el punto (b) (aunque los volúmenes de estanque están fuera del rango aceptado por el modelo) y se corrigió por medio del índice CEPCI (Chemical Engineering Pant Index) (ver Apéndice D.2), indicador económico de la revista Chemical Engineering Magazine. Este método de corrección se ha utilizado como estándar para la determinación de costos de equipos de un período a otro, desde su actualización en 2009 (Couper, Penney, Fair, & Wales, 2012). Es importante mencionar que no se utilizó la estimación por escalamiento ya que los volúmenes de los estanques son bastante inferiores a los aceptados por los modelos tanto para ese método (c) como para el presentado en (b), por lo que estimar el valor a través del método (b) y luego escalar hubiera incluido dos errores en lugar de uno solo.

En este caso, más allá de los equipos instalados, existen materiales (columnas para las cromatografías, geles de cromatografías, membranas de filtración, etc.) que no requieren instalación o cuyo factor de instalación es 1, pero sí deben ser incorporados los costos de equipos instalados.

Es importante mencionar que al realizar la cotización de la mayoría de los equipos, se contactó a los representantes nacionales de cada marca (ver Anexo D.2) por lo que los valores de equipos entregados ya considerarían el costo aduanero. Sólo para los equipos E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6 y E-7 se consideró el impuesto aduanero del derecho *ad valorem* considerado un 6% del valor de la mercancía (Aduanas Chile, s.f.). De esta manera, en la Tabla 7.2 se presenta la cantidad de equipos requeridos, los costos F.O.B. corregidos y los costos netos, de entrega y de instalación al detalle y totales (CE, CEE y CEI).

Línea Celular

Aunque este no sea un ítem típico se debe incluir en el capital fijo directo el valor de la línea celular CHO que será adquirida en un inicio y almacenada en frío. El valor de línea celular asciende a 9,77 [UF] (ATCC, 2013)

Aislamiento

El resto de los costos fijos directos involucran: aislamiento, terreno, mejoramientos de terreno, servicios incluidos en la construcción, instrumentación y control (I&C), tuberías, instalaciones eléctricas y de servicios.

En este caso, no se incluirán costos de aislamiento, pues están destinados para casos en los que se trabaje con intercambiadores de calor, tuberías que requieren recubrimientos, etc. (Peters & Timmerhaus, 1991) cuando el proyecto no cuenta con ese tipo de instalaciones y equipos.

Terreno, mejoramientos de terreno y servicios de construcción

Por otra parte los costos asociados a mejoramiento de terreno y terreno también son omitidos, ya que el proceso de producción sería adquirido por una empresa que cuenta con un terreno adecuado para la instalación. Sin embargo si se consideran los costos asociados a la construcción suponiendo la expansión de un sitio existente (Peters & Timmerhaus, 1991) para incorporar la línea productiva (ver Tabla 7.3).

Instrumentación y control

Respecto a la I & C, este ítem es el que constituye la mayor proporción de gasto en este grupo, en el que dependiendo de la complejidad de los instrumentos los cargos pueden variar entre el 50 y 70% del total del costo de equipos entregados (Peters & Timmerhaus, 1991). Si bien en este caso, el proceso es más bien simple y a pequeña escala, se debe considerar que los equipos cromatográficos y el reactor cuentan con softwares de control que no pudieron ser cotizados, por lo que se decide utilizar el factor presentado en la Tabla 7.3).

Tabla 7.2: Costos de equipos del procesos productivo.

Etapas	Nomenclatura	Equipo	Costo F.O.B. 2013 [UF]	CE Neto ^(a) [UF]	Cantidad Material	CEE ^(b) [UF]	Fi	CEI [UF]
Esterilización	-	Microfiltro de 0,1 µm	-	8,07	2	17,75	1	17,75
	W-1;W-2	Equipo purificador de agua	-	551,76	2	1.213,88	3	3.641,64
Agua	-	Filtro de ventilación	-	4,17	2	9,17	1	9,17
	-	Filtro de CO ₂	-	8,43	2	18,54	1	18,54
	-	Filtro de Esterilización	-	9,59	2	21,09	1	21,09
	-	Cartridge de Desinfección	-	13,37	2	29,41	1	29,41
	E-1	Estanque de Almacenamiento	39,87	42,26	1	46,48	1,5	69,73
	E-2	Estanque de Almacenamiento	210,66	223,29	1	245,62	1,5	368,44
Propagación	-	T-Flask 25: 7 [ml]	-	10,99	1	12,09	1	12,09
	-	T-Flask 25: 10 [ml]	-	11,65	1	12,81	1	12,81
	-	T-Flask 150: 175 [ml]	-	9,04	1	9,95	1	9,95
	-	Spinner Flask 1 [l]	-	19,10	1	21,01	1	21,01
	-	Spinner Flask 3 [l]	-	22,39	1	24,63	1	24,63
	-	Spinner Flask 6 [l]	-	26,97	1	29,66	1	29,66
Producción	-	Shaker	-	27,64	1	30,41	1	30,41
	-	Agitador Magnético	-	20,39	1	22,43	1	22,43
	R-1	Bioreactor	-	1.799,63	1	1.979,60	1,6	3.167,35
	-	Bolsas Single-Use Bioreactor	-	52,12	6	343,97	1	343,97
	E-3;E-4	Estanque Agitado	149,75	158,74	2	349,22	1,8	628,59
	-	Bolsas Single-Use Medio	76,52	81,11	6	535,33	1	535,33
Recuperación y Purificación	-	Bolsas Single-Use Producto	72,88	77,25	6	509,84	1	509,84
	E-5;E-6;E-7	Soporte Estantes Bolsa S-U	140,85	149,30	3	492,68	1	492,68
	-	Membrana de Ultrafiltración 30 kDa	-	132,84	4	584,49	1	584,49
	UF-1;UF-2	Equipo de Ultrafiltración	-	162,81	2	358,19	1,4	501,46
	C-1;C-2	Equipo Cromatográfico	-	3.642,35	1	4.006,58	1,4	5.609,22
	C-1	Columna Cromatográfica 200	-	287,53	1	316,28	1	316,28
Bombas	C-2	Columna Cromatográfica 140	-	265,68	1	292,24	1	292,24
	-	Medio de HIC: butyl-Sepharose 4 FF	-	256,29	1	281,92	1	281,92
	-	Medio de SEC: Sephacryl S-100	-	38,11	2	83,85	1	83,85
	B-1;B-2; B3; B-6	Bomba Peristáltica	-	77,16	4	339,49	1,4	475,28
	B-4;B-5	Bomba Peristáltica	-	30,23	2	66,50	1,4	93,10
	B-7;B-8	Bomba Peristáltica	-	111,41	2	245,11	1,4	343,15
Total			8.331,66		12.550,24		18.597,53	

(a) Considera el costo neto de cada equipo, incluyendo el impuesto aduanero.

(b) Se incluye un 10% al valor neto, por costos de entrega; y se multiplica por la cantidad adquirida.

CE: Costo Equipo CEE: Costo Equipo Entregado CEI: Costo Equipo Instalado Fi: Factor de Instalación

Instalaciones eléctricas y de servicios

Los costos de instalaciones eléctricas contemplan los gastos de la instalación de materiales y elementos de poder e iluminación, teniendo un rango típico de 10 a 15% del costos de equipos entregados (Peters & Timmerhaus, 1991). El valor escogido (ver Tabla 7.3), considera que el lugar debe contar con muy buena iluminación, que existe un gran consumo energético y que además se debe contar con sistemas de sanitización de aire, etc.

Finalmente las instalaciones de servicios están asociadas a los artículos que proveen vapor, agua, potencia, aire y combustible; y también se incluyen los artículos de primeros auxilios, equipamiento de cafetería, etc. En general el rango varía de 30 a 80% del costo total de equipos entregados, donde los valores más bajos son asociados a plantas pequeñas que producen un producto (Peters & Timmerhaus, 1991). Se escoge el valor teniendo en consideración que los elementos de mayor uso son los que proporcionan aire, agua y potencia, pero sabiendo también que varios de ellos ya están considerados en el costo total de equipos entregados.

Tabla 7.3: Porcentajes de costos asociados al Capital fijo directo.

Costo	Porcentaje de CEE
Servicios de Construcción	6%
I & C	60%
Tuberías	16%
Instalaciones eléctricas	15%
Instalaciones de Suministros	40%

* CEE: Costo de Equipos Entregados

Capital fijo directo (CFD)

El total de capital fijo directo se presenta en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4: Capital fijo directo

Costo	Valor [UF]
Equipos instalados (CEI)	18.597,53
Línea Celular	9,77
Servicios de Construcción	753,01
Instrumentación y Control	7.530,14
Cañerías	2.008,04
Instalaciones eléctricas	1.882,54
Instalaciones de Suministros	5.020,10
Total CFD	35.801,13

7.1.2 Capital Fijo Indirecto (CFI)

Ingeniería y Supervisión

Corresponden a los costos de diseño e ingeniería de la construcción de la planta, incluyendo transporte, comunicaciones, gastos de oficina, etc. y se le atribuye típicamente un valor del 30% del CEE o 8% del CFD (Peters & Timmerhaus, 1991). Sin embargo, considerando que el desarrollo del proyecto se llevaría a cabo por una empresa que cuenta con instalaciones y que en el peor de los casos debe realizar una expansión de las mismas para la instalación de la línea productiva (descontando oficinas y lugares administrativos), se puede asumir un valor del 5% para este ítem.

Gastos de construcción: Pago de contratista y contingencias

Como ya se ha mencionado, los gastos asociados a construcción se estiman como mínimos, considerando el contexto de desarrollo del presente proyecto. Teniendo en cuenta lo anterior, el costo asociado al contratista varía desde 2 a 8% del CFD; mientras que los gastos de contingencia que cubren eventos impredecibles (tormentas, inundaciones, variaciones de precio, cambios de diseño pequeños, errores de estimación y otros gastos imprevistos) fluctúan entre el 5 y 15% del CFD (Peters

& Timmerhaus, 1991). Así, los valores escogidos para cada uno de los casos se presentan en la Tabla 7.5.

Gastos legales

Se considera este ítem adicional ya que en el caso de este proyecto, se requiere tramitación de validación, homologación, autorizaciones de distinta índole y cumplimiento de normativas y exigencias relacionadas al ámbito de la salud y farmacia, por lo que es de gran importancia destinar parte del capital a cubrir esos gastos.

Capital fijo indirecto (CFI)

En la Tabla 7.5 se presentan los porcentajes y valores finales de cada uno de los ítems considerados y el valor final del capital fijo indirecto.

Tabla 7.5: Capital fijo indirecto (CFI)

Capital Fijo Indirecto	% CFD	Valor [UF]
Ingeniería y Supervisión	5	1.790,06
Gastos Legales	8	2.864,09
Pago de Contratistas	4	1.432,05
Contingencia	10	3.580,11
Total		9.666,31

7.1.3 Capital de Trabajo (WC)

El capital de trabajo consiste en la cantidad total de dinero invertida en materia prima y provisiones, producto terminado y en proceso de fabricación, cuentas por cobrar, dinero mantenido a mano para el pago mensual de gastos de operación como remuneraciones, adquisiciones de materia prima, pago de impuesto y cuentas (Peters & Timmerhaus, 1991). La razón inicial típica de capital de trabajo a capital total de inversión para plantas químicas varía de 10 a 20 (Peters & Timmerhaus, 1991); de acuerdo a ello y considerando que se cuenta ya con el valor de ciertas provisiones en los CFD, se utilizará una razón del 15% del capital total de inversión (ver Tabla 7.6).

7.1.4 Capital Total de Inversión

Una vez calculado el capital fijo total (directo más indirecto) y sabiendo que la sumatoria de ese valor y el capital de trabajo corresponde al capital total de inversión; y que el capital de trabajo corresponde al 15% de este último se obtienen los valores de inversión finales presentados en la Tabla 7.6.

Tabla 7.6: Capital total de inversión

Tipo de Capital	Valor [UF]
Capital Fijo Inversión	45.467,44
Capital de Trabajo	8.023,67
Capital Total Inversión	53.491,10

7.2 COSTOS TOTALES DE PRODUCCIÓN

Estos costos corresponden a un estimado para operar la planta y vender el producto y son subdivididos en costos de manufactura y costos generales de producción. Se trabajará en base anual para estimar el total de costos según se recomienda, ya que se suavizan los efectos de las variaciones de temporada, se considera el tiempo de reacción de la planta, permite calcular de forma más rápida los costos operacionales a menor capacidad, y provee una forma conveniente de considerar grandes gastos poco frecuentes (por ejemplo cambios de tendencias) (Peters & Timmerhaus, 1991).

7.2.1 Costos de Manufactura

Los costos de manufactura, de producción o de operación, contemplan todos los gastos que tienen relación con la operación o el equipamiento de la planta y son sub-clasificados en costos directos de producción, cargos fijos y costos generales de planta (Peters & Timmerhaus, 1991)

Costos directos de producción

Incluyen los gastos que se relacionan directamente con la manufactura del producto, como por ejemplo materia prima, suministros básicos (energía y agua), trabajo directo en la planta así como también en oficina (mano de obra), mantenimiento y reparaciones, suministros de operación, costos de laboratorio.

Materia prima

En este caso, se considera como única materia prima el costo del medio de cultivo, ya que la línea celular será adquirida en un inicio y se realizará una propagación, siendo considerada en la inversión. El costo del medio de cultivo IMDM se presenta en la Tabla 7.9.

Suministros básicos

Al no establecer gastos de vapor, asumiendo que sólo se requiere en la esterilización de material de laboratorio y que la empresa que implemente el proyecto ya cuenta con la implementación necesaria, los suministros básicos se reducen a los expuestos en la Tabla 7.7. El consumo anual en cada uno de los casos fue calculado según se explica en Apéndice C.9. Las tarifas de agua (Aguas Andina S.A, 2014) y electricidad (Chilectra S.A., 2014) fueron obtenidas suponiendo que la planta se ubica en la ciudad de Santiago.

Tabla 7.7: Costo anual de agua y electricidad

Tipo de suministro	Consumo anual	Valor por unidad de consumo [CLP]	Total Anual [UF]
Agua [m ³]	44,41	307,83	0,59
Electricidad [kW]	62.192,20	97,992	261,15
Total			261,74

Mano de obra

Según lo desarrollado en el Capítulo 6 los requerimientos de manos de obra y el costo asociado corresponden a los presentados en la Tabla 7.8, el valor total se presenta en la Tabla 7.9.

Para la determinación de estos valores se obtuvo un estimado del sueldo líquido o neto mensual para cada cargo por medio de una base de datos pública del Gobierno de Chile (Ministerio de Educación, Gobierno de Chile, 2013), además se consideró el pago de un 20% sobre el sueldo líquido en cotizaciones obligatorias (7% destinado a salud y 13% a previsión) entregando el sueldo bruto para cada caso.

Por otro lado, para la determinación del costo anual se consideró un total de 13 meses, correspondiendo al año de trabajo y al mes de indemnización asociado a ese año de trabajo; y además se multiplicó por la cantidad de trabajadores en cada cargo.

Mantenimiento y reparaciones

Para procesos promedio con condiciones de operación normales se estima que este tipo de costos varía entre un 5 a 9% del capital fijo de inversión (Peters & Timmerhaus, 1991). Considerando que se trata de un proceso más bien sencillo se opta por considerar un 6% del capital fijo de inversión, entregando un total presentado en la Tabla 7.9.

Suministros de operación

Aquí se consideran los gastos relacionados a todos los suministros necesarios para mantener un funcionamiento eficiente y que no pueden ser considerados como materia prima o materiales de mantenimiento y reparación (por ejemplo: lubricantes, ensayos químicos, etc.); ascendiendo a un 15% del total de gastos de mantención y reparaciones (Peters & Timmerhaus, 1991). El valor asociado en este caso, se presenta en la Tabla 7.9.

Costos de laboratorio

Este costo considera los gastos del testeo para control de las operaciones y calidad del producto; y puede estimarse de forma rápida como un 10 a 20% del costo de mano de operación (producción) (Peters & Timmerhaus, 1991). Dado que el proyecto consiste en un trabajo de laboratorio se decide considerar como parámetro el 20%.

Tabla 7.8: Costo de mano de obra según departamento.

Sección	Cargo	Perfil	Número de Personas	Sueldo Neto [CLP/mes]	Sueldo Bruto [CLP/mes]	Sueldo Total [CLP/mes]	Sueldo Total [UF/año]	Sueldos por Sección [UF/año]
Administración	Jefe de Planta	Ingeniero Civil Bioquímico con MBA	1	2.200.000	2.750.000	2.750.000	1.531,93	1.775,65
	Secretaría	Secretariado Ejecutivo Gerencial	1	350.000	437.500	437.500	243,72	
	Jefe de Producción	Ingeniero Civil Bioquímico	1	1.200.000	1.500.000	1.500.000	835,60	
Producción	Jefe de Turno	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	3	750.000	937.500	2.812.500	1.566,75	
	Operario de Producción	Técnico Operador de Plantas Industriales	4	550.000	687.500	2.750.000	1.531,93	5.466,20
	Operario de Purificación	Técnico Operador de Plantas Industriales	2	550.000	687.500	1.375.000	765,96	
	Operario de Turno	Técnico Operador de Plantas Industriales	2	550.000	687.500	1.375.000	765,96	
	Supervisor de Calidad	Técnico de Nivel Superior en Gestión y Control de Calidad	1	550.000	750.000	750.000	417,80	800,78
Investigación y Desarrollo	Analista Bioquímico	Bioquímico	1	600.000	687.500	687.500	382,98	
	Jefe de Investigación	Ingeniero Civil Bioquímico	1	1.200.000	1.500.000	1.500.000	835,60	
	Investigador	Químico Farmacéutico	1	1.000.000	1.250.000	1.250.000	696,33	
	Investigador	Bioquímico	1	600.000	750.000	750.000	417,80	2.367,53
	Investigador Externo	Depende de la investigación que se desarrolle	1	600.000	750.000	750.000	417,80	

Cargos fijos y costos generales de planta

Son aquellos costos que permanecen constantes año a año y no varían de forma significativa con cambios en la tasa de producción (depreciación, impuestos, seguros). Asimismo los costos generales de planta tampoco varían demasiado, por lo que se considerarán ambos ítems como cargos fijos.

Depreciación

El equipamiento, los inmuebles y otros materiales involucrados en una planta de manufactura presentan una disminución de su valor en el tiempo denominado depreciación y la determinación de este valor es importante a la hora de considerar el costo de los impuestos (Peters & Timmerhaus, 1991). Existen diversos métodos de cálculo de la depreciación, definidos según la vida útil y valor residual establecidos para cada uno los bienes; uno de estas metodologías muy utilizada en proyectos de ingeniería es la depreciación lineal que considera la diferencia del costo inicial y el valor residual dividido en la cantidad de años de la vida útil del bien, donde la maquinaria se deprecia a una tasa anual del 10% del capital invertido y los inmuebles a una tasa del 3% (Peters & Timmerhaus, 1991).

Sin embargo, el Servicio de Impuestos Internos (SII) de Chile ha fijado en la “Nueva Tabla de Vida Útil” vigente desde 2003 que la depreciación para la maquinaria general tiene una vida útil de 15 años y se deprecia de forma acelerada en 5 años (Servicio de Impuestos Internos , 2003). Este tipo de depreciación se calcula de la misma forma que la depreciación lineal (Ec. 49) pero dividiendo por la cantidad de años de depreciación.

$$d = \frac{V_o - V_R}{n} \quad (Ec. 49)$$

Donde,

d: Depreciación

V_R : Valor residual

V_o : Valor inicial

n: Período de depreciación

En este caso, se decidió considerar un valor residual equivalente al 10% del valor inicial. Por otro lado, al no contar con un inmueble exclusivo para la instalación de la planta, se decide considerar en la depreciación sólo los equipos y materiales de acuerdo a lo fijado por el SII. La depreciación no se presentará en esta sección sino que como parte del flujo de caja.

Impuestos

Tal como el caso de depreciación los impuestos no son incorporados en esta sección sino que forman parte del flujo de caja; donde se consideran el impuesto a la utilidad y el impuesto a la ganancia de capital. El primero se establece como impuesto de primera categoría correspondiendo a una tasa del 20% desde el año 2011 (Servicio de Impuestos Internos, 2013); por otro lado, la ganancia de capital se considera como renta normal, por lo que grava con impuesto de primera categoría e impuesto global complementario o adicional según sea el caso (Servicio de Impuestos Internos), en este caso se aplica el impuesto de primera categoría.

Seguros

Los seguros dependen del tipo de proceso llevado a cabo y la extensión de las dependencias disponibles a protección y anualmente se puede estimar como un 1% de capital fijo de inversión (Peters & Timmerhaus, 1991). El valor obtenido utilizando ese valor de índice se presenta en la Tabla 7.9.

Costos generales de planta

Los gastos requeridos para los servicios de rutina de la planta son considerados en este ítem; en este caso los gastos de interés relacionados a este costo de operación de planta son aquellos de laboratorio de control, envasado, iluminación; sin embargo el total de costos relacionados a este ítem es mayor al nombrado (incluyendo gastos de maestranza, cafetería, enfermería, tiendas, etc.), significando entre un 50 a 70% del total de mano de obra de producción, supervisión y mantenimiento (Peters & Timmerhaus, 1991). De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que no se considerarán todos los costos asociados, se puede estimar una tasa del 30% del costo de mano de obra de producción y supervisión (no hay costo de mantención destinado exclusivamente a esta línea de producción asumiendo que la empresa cuenta con dicho departamento).

Costos de manufactura

Se presenta la Tabla 7.9 que incorpora los ítems mencionados, a excepción de la depreciación y los impuestos, incluidos en el flujo de caja.

Tabla 7.9: Costos de manufactura

Costo	Ítem	Valor [UF]
Directos	Materia prima	3.010,56
	Suministros básicos	261,74
	Mano de obra	10.584,24
	Mantenimiento y reparaciones	2.728,05
	Suministros de operación	409,21
	Costos de laboratorio	1.093,24
Fijos	Seguros	454,67
	Costos generales de planta	3.760,19
Total		22.301,89

7.2.2 Costos Generales de Producción

Estos costos generales no están asociados directamente a la manufactura pero consideran otros gastos de producción, como por ejemplo administrativos, distribución y marketing, investigación y desarrollo, entre otros (Peters & Timmerhaus, 1991).

Costos administrativos

Se consideran los costos de salarios de administradores, secretarias, contadores, costos de suministros de oficina y equipamiento, edificios administrativos, comunicaciones y otros costos adicionales relacionados con la administración; variando entre 20 y 30% del costo de mano de obra de producción (Peters & Timmerhaus, 1991). El valor obtenido al utilizar una tasa del 10% se presenta en la Tabla 7.10. Se decide utilizar esa tasa, ya que se cuentan con los costos asociados a salarios mencionados, no se incluyen edificios administrativos ni contadores.

Distribución y marketing

Estos costos varían desde un 2 a 20% del total de costo de producto según la locación de la planta, el tipo de producto a comercializar, otros productos vendidos por la compañía, y según las políticas de la empresa (Peters & Timmerhaus, 1991). Se decide considerar el 2% del costo total de producto.

Investigación y desarrollo (I+D)

Este ítem incluye los salarios para el personal involucrado, costos fijos y de operación de la maquinaria y equipamiento, costos de materiales y suministros, y costos varios; lo que varía entre un 2 a 5% de las ventas (Peters & Timmerhaus, 1991).

Como se explica en el Capítulo 6, este ítem es de suma importancia por lo que se piensa que la tasa considerada en función de las ventas es muy baja. Así, se decide considerar el departamento de I+D como parte de la producción, estableciendo destinando un valor del 15% del costo total de mano de obra de producción a dicho departamento.

7.2.3 Costos de Producción

En la Tabla 7.10 se presentan en detalle los costos asociados a la producción de este proyecto. Para el cálculo de los costos de “Distribución y Marketing” correspondiente al 2% del total de producción, al conocer el resto de los valores de gastos generales y de manufactura, y sabiendo que estos corresponden entonces al 98% del costo total de producción se determinó el valor del ítem de “Distribución y Marketing”.

Tabla 7.10: Costos de producto

Tipo de Costo	Valor [UF]
Manufactura	22.301,89
Generales	
Administración	546,62
Distribución y Marketing	534,57
Investigación y Desarrollo	3.345,28
Total Costos de Producción	26.728,36

7.3 INGRESOS

Para este caso de evaluación, los ingresos anuales corresponderían a las ventas de proteína realizadas. De acuerdo a ello y según lo determinado en el Capítulo 2 respecto a la capacidad de la el 2023 y lo programado en el Capítulo 6, se conoce que la producción será variable en cada uno de los años, por lo que los ingresos también lo serán.

Por otro lado, los ingresos también quedarán definidos por el precio de venta, y dado que el precio actual en Chile queda fuera del alcance de muchos casos, se pretende proporcionar la proteína a un valor menor al actual (2.800.000 [CLP/mg]). De esa manera se comienza el análisis con un valor neto de venta equivalente al 40% del valor comercial actual, lo que significa un valor de 47,99 [UF/mg] (1.120.000 [CLP/mg]); de acuerdo a ello se presentan en la Tabla 7.11 los ingresos asociados a la cantidad de *rhBMP-2* producida por año según la programación mencionada. Es importante mencionar que este porcentaje (40%) es inicial y se requiere del análisis de sensibilidad para poder establecer de mejor forma un valor adecuado.

Tabla 7.11: Ingresos por venta

Año	Producción [mg <i>rh BMP-2</i>]	Capacidad Utilizada [%]	Ingresos por venta [UF]
0	-	-	-
1	1368,78	89,06	65.692,25
2	1387,35	90,26	66.583,66
3	1405,94	91,47	67.475,93
4	1424,55	92,68	68.369,05
5	1443,18	93,90	69.263,02
6	1461,83	95,11	70.157,85
7	1480,49	96,32	71.053,53
8	1499,17	97,54	71.950,06
9	1517,87	98,76	72.847,44
10	1536,58	99,97	73.745,68

7.4 FLUJO DE CAJA

Para el desarrollo del flujo de caja, se considerarán como costos fijos (aquellos costos independientes de la capacidad de la planta y que no varían en el tiempo) los costos fijos de producción y además la mano de obra, los costos de mantenimiento y reparaciones, suministros de operación, costos de laboratorio y los costos generales de producción. En primer lugar, la mano de obra se mantiene constante durante todos los años del estudio y cualquier reajuste económico ya es considerado por la unidad monetaria utilizada (UF); el resto de los costos se estiman relativamente constantes, ya que la planta comienza su puesta en marcha a un 89% de capacidad utilizando la totalidad de sus equipos y

capacidad administrativa, pudiendo asumir que no existirá una variación muy significativa de estos costos asociados.

Por otro lado, los costos variables se reducirían a los costos de materia prima, ya que según la programación presentada en el Capítulo 6 existen variaciones sustanciales en los días de cultivo por lote, lo que significaría una disminución en la cantidad de medio requerido por ende una disminución en la cantidad de agua y energía requerida para los cultivos.

Además es importante destacar que todos los costos estimados en las secciones anteriores de este capítulo corresponden a la capacidad máxima de la planta (año 2023), por lo que se recalculan los costos variables para cada uno de los años. Este cálculo se realiza en función del costo variable por miligramo de proteína, establecido según los costos variables asociados al año 2023 (sumatoria de materia prima y suministros básicos) y la cantidad de proteína a producir ese año (1537 [mg]); lo que entrega un valor de 2,12 [UF/mg] (sólo por costos variables). De esta manera, la producción de *rhBMP-2* de cada año se multiplica por el valor variable por miligramo y se obtienen los costos variables asociados a ese año.

A los costos variables mencionados, se le incorporan los costos por compra renovación de materiales que no es realizada de forma anual; estos materiales son presentados en la Tabla 7.12 junto con el año en el que habría que considerar una nueva adquisición de los mismos (esto según la vida útil estimada, correspondiente a las exigencias de esta industria).

Tabla 7.12: Reinversión de material

Vida Útil	Material	Gasto Total Asociado [UF]
2 años	Spinner Flasks Membrana de 30 kDa	659,79
5 años*	T-flask	34,85

* Se considera una vida útil de 5 años ya que las cantidades por paquete adquiridas por inversión van desde las 50 a 200 unidades según su volumen.

Tabla 7.13: Flujo de caja del proyecto

Período (n)	Ingresos [UF]	Inversión [UF]	Costos [UF]		FAI [UF]	Depreciación [UF]	FSI [UF]	Impuestos [UF]	FDI [UF]
			Fijos	Variables					
0	-	- 53.491,10	-	-	-	-	-	-	-
1	65.692,25	-	23.457,24	2.914,15	39.320,86	1.499,70	37.821,16	7.564,23	53.491,10
2	66.583,66	-	23.457,24	2.953,69	659,79	1.499,70	38.013,24	7.602,65	30.256,93
3	67.475,93	-	23.457,24	2.993,28	-	1.499,70	39.525,72	7.905,14	30.410,59
4	68.369,05	-	23.457,24	3.032,89	659,79	1.499,70	39.719,43	7.943,89	31.620,57
5	69.263,02	-	23.457,24	3.072,55	34,85	1.499,70	41.198,69	8.239,74	31.775,54
6	70.157,85	-	23.457,24	3.112,25	659,79	-	42.928,57	8.585,71	32.958,95
7	71.053,53	-	23.457,24	3.151,98	-	-	44.444,31	8.888,86	34.342,86
8	71.950,06	-	23.457,24	3.191,75	659,79	-	44.641,28	8.928,26	35.555,45
9	72.847,44	-	23.457,24	3.231,56	-	-	46.158,64	9.231,73	35.713,02
10	73.745,68	-	23.457,24	3.271,40	-	-	47.017,03	9.403,41	36.926,91
10					833,17	-	833,17	166,63	37.613,63
FAI: Flujo Antes de Impuestos			FSI: Flujo Sujeto a Impuestos		FDI: Flujo Después de Impuestos				

7.5 RENTABILIDAD ECONÓMICA

Como primera observación, es importante destacar que los valores utilizados en un flujo de caja corresponden a valores netos (sin IVA), ya que el manejo del IVA está regulado por las disposiciones contables emitidas por el Servicio de Impuestos Internos (SII) de Chile; y no tiene mayor efecto económico en el proyecto sino que en el consumidor final. Entonces, para determinación del capital total de inversión, aquel con el se realizará el pago real de todo el equipamiento, material y servicios considerados se debe incluir un 19% adicional correspondiente al IVA al que estarán sujetos los precios y que no están considerados en el flujo de caja. Respecto al funcionamiento durante los años de operación, tal como se menciona, el manejo contable mensual será el encargado de clasificar los gastos netos, los gastos por IVA y los ingresos por ventas con su respectivo IVA, realizando el balance de impuestos adecuado.

Para este análisis se escoge una tasa mínima de retorno aceptada (TRMA) del 15%, considerándose pertinente para el interés del inversionista.

Así, basándose en el flujo de caja presentado en la Tabla 7.13 se obtiene una Valor Actual Neto (VAN) positivo de 111.007,11 [UF] y una Tasa Interna de Retorno (TIR) de 58% como se puede observar en la Figura 7.1. De esta manera, el proyecto entrega una rentabilidad mayor a la mínima aceptada (15%) pudiendo establecer que con un precio de venta neto de 47,99[UF/mg] se obtendría un proyecto rentable

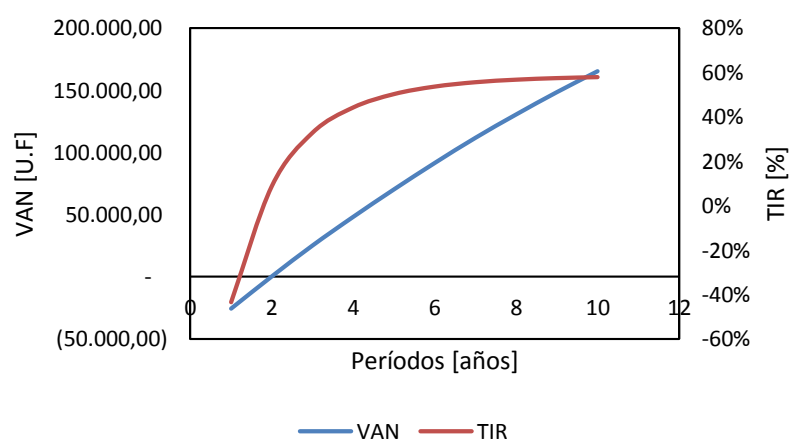


Figura 7.1: Representación gráfica de VAN y TIR del proyecto.

7.6 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

En esta sección se busca analizar la variación de los indicadores económicos seleccionados frente a escenarios diferentes al actual. Con este fin se evaluará la variación en el precio de la materia prima y en el precio de venta de la proteína de acuerdo a lo señalado anteriormente.

7.6.1 Variación en la materia prima: Medio de Cultivo IMDM

En cuanto al precio del medio de cultivo, se evaluaron distintos escenarios que van desde un costo de materia prima 50% menor al actual hasta un costo 50% mayor. Los resultados se presentan en la Figura 7.2 donde se observa un comportamiento lineal en el cambio de los indicadores (para el VAN y la TIR se obtiene un $R^2=1$), donde a pesar de los cambios en el costo de la materia prima, la TIR sigue siendo mayor a la TRMA en todo momento por lo que el proyecto sigue siendo rentable, y sólo con un aumento del valor de la materia prima de un 831% se provocaría un impacto real en el proyecto llevándolo a un VAN igual a cero y a un TIR igual a la TRMA.

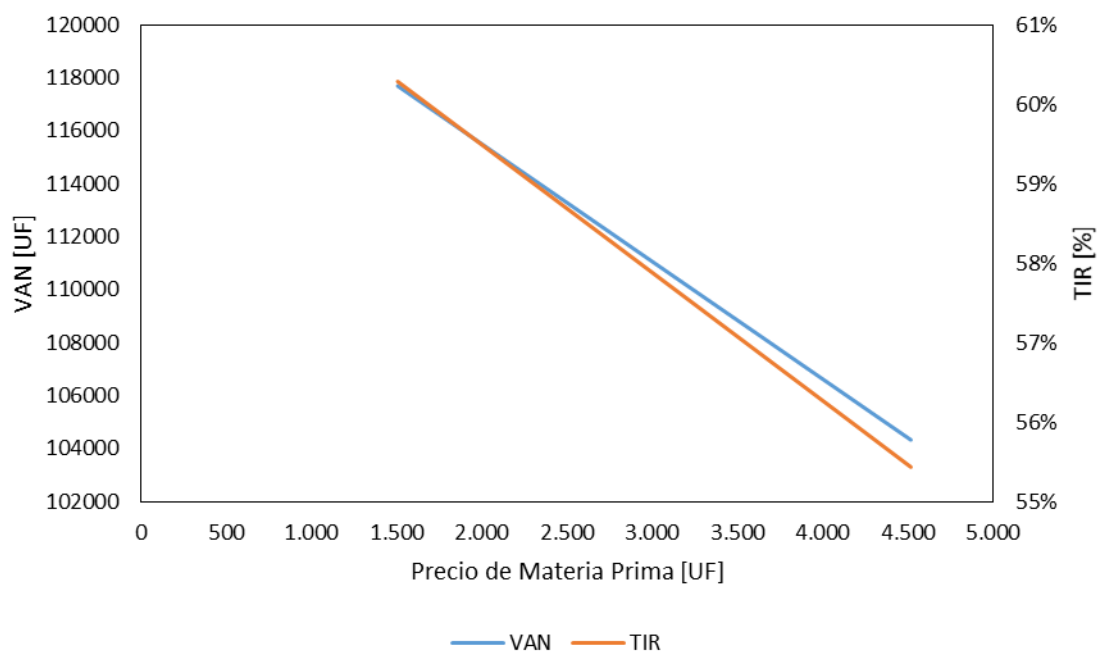


Figura 7.2: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de la materia prima.

7.6.2 Variación en Precio de Venta de *rhBMP-2*

El precio de la proteína fue evaluado del mismo modo que el precio de la materia prima, aumentando y disminuyendo su costo en un 50%. Los resultados se presentan en la Figura 7.3 donde se observa un comportamiento lineal en el cambio de los indicadores (para el VAN se obtiene un $R^2=1$ y para la TIR un $R^2=0,9984$). En este caso, la TIR es mayor a la TRMA en casi todos los casos, excepto en el escenario en que se disminuye su precio de venta en un 50%, caso para el cual el VAN se torna negativo. Por lo que el precio al cual se vende el producto (al ser la única fuente de ingreso considerada para la planta), representa un factor clave en la rentabilidad del proyecto.

Al analizar el gráfico presentado (Figura 7.3) se observa que el VAN comienza a ser negativo para precios de venta de proteína de alrededor de 28 UF por miligramo, por lo que ya no sería rentable utilizando valores de venta de la proteína iguales o menores al mencionado.

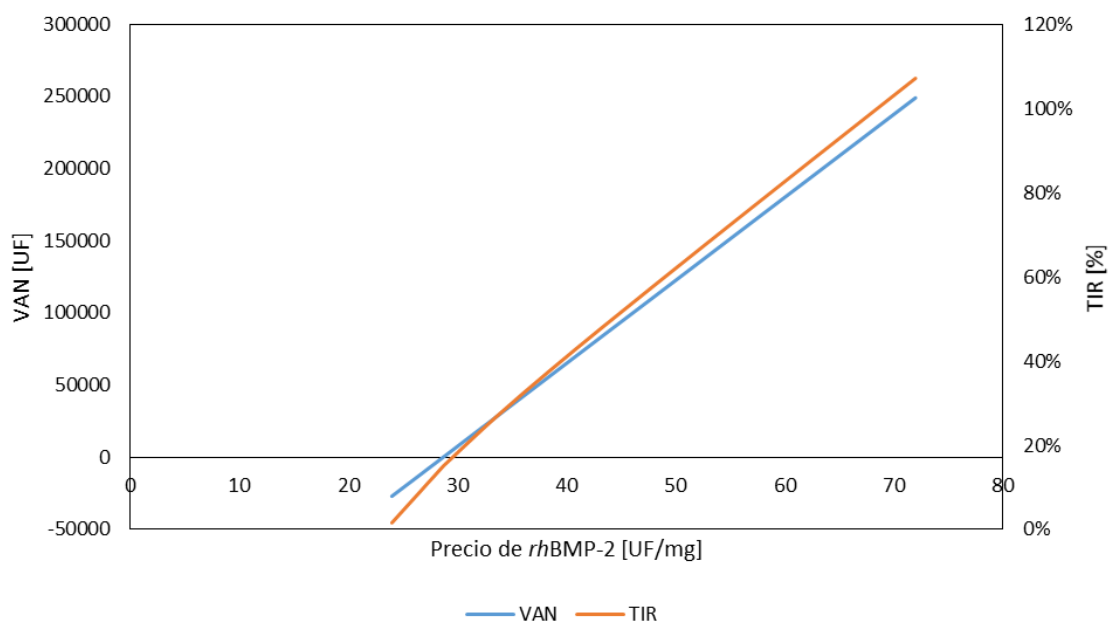


Figura 7.3: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta del producto.

7.6.3 Período de Retorno de Capital

Si bien los parámetros evaluados hasta ahora (VAN y TIR) son atractivos en casi todos los escenarios, otro parámetro a evaluar es el período en el que el inversionista recupera su capital invertido. El comportamiento de esta función en base a los distintos escenarios, es un indicio de si el parámetro evaluado es significativo o de alto impacto en la rentabilidad del proyecto.

En la Tabla 7.14, se muestra el período de retorno de capital (PCR) de la sensibilidad de la materia prima y del precio de venta del producto en los distintos escenarios planteados. PRC 1, corresponde a la variación en la materia prima, donde sin importar la variación que se realice, siempre se recupera la inversión al tercer año del proyecto. PRC 2, corresponde a la variación en el precio de venta de la proteína en la que sí existe una fluctuación mayor de los años relacionados a la recuperación de capital. Por ejemplo, con una reducción mayor al 40% del valor original de venta de la proteína, el período de retorno de capital asciende a 10 años o más; mientras que si, por el contrario, existe un aumento del 10 al 50% del valor de venta, el período de recuperación se mantiene en 2 años.

Tabla 7.14: Período de Retorno de Capital para ambas variaciones.

Escenario (Variación de precio)	PRC 1 [años]	PRC 2 [años]
-50%	3	Más de 10
-40%	3	10
-30%	3	6
-20%	3	4
-10%	3	3
0%	3	3
10%	3	2
20%	3	2
30%	3	2
40%	3	2
50%	3	2

7.6.4 Penetración Progresiva en el Mercado

Es probable que al lanzar una nueva marca de medicamentos, no sea capaz de abarcarse el 35% del mercado de forma inmediata, ya que por mucho que se disminuya el precio en comparación a la

competencia, hay un factor clave que debe considerarse al trabajar con medicamentos, que es la confianza del consumidor hacia el producto, es por esto que los primeros años el medicamento entrará en el mercado y se dará a conocer y se espera que las ventas vayan aumentando en forma progresiva a través de los años.

De esta forma, es que se sensibilizará el precio de venta de la proteína (ya que el medio de cultivo fue descartado como significativo), de acuerdo al plan de proyección de la demanda que se pretende abarcar que se muestra en la Tabla 7.15.

Tabla 7.15: Proyección de la demanda que se pretende abarcar en cada período.

Año	Demanda [mg rh BMP-2]	Porcentaje a cubrir de la demanda [%]
0	-	-
1	3910,80	35
2	3963,87	35
3	4016,99	35
4	4070,15	35
5	4123,37	35
6	4176,65	35
7	4229,97	35
8	4283,34	35
9	4336,76	35
10	4390,24	35

Con esta proyección, si se realizan los flujos de caja para las condiciones fijadas en la evaluación económica del proyecto, se observa un VAN positivo y un TIR del 30%. Se establece como parámetro de aceptación que el TIR debe ser mayor a la TRMA y que el VAN debe ser positivo. En este caso, ambas condiciones se cumplen, por lo que el proyecto resultaría rentable recuperando el capital invertido al sexto año aproximadamente, como se aprecia en la Figura 7.4.

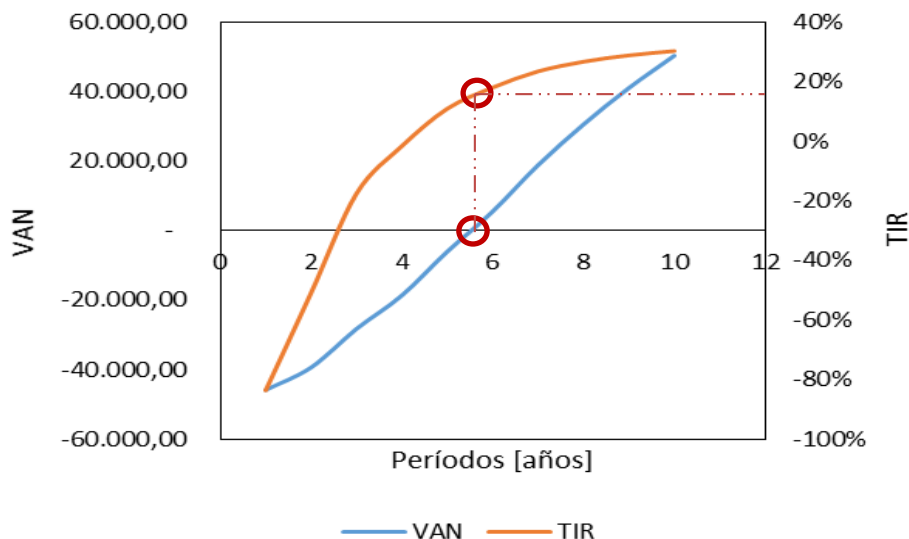


Figura 7.4: Evolución del VAN y el TIR por período con Demanda Progresiva. Los puntos de interés marcados corresponderían a los que determinan la rentabilidad del proyecto.

De esta manera, al sensibilizar el precio de la proteína de la misma forma en que se realizó anteriormente, se obtienen los resultados expuestos en la Tabla 7.16 para cada uno de los escenarios.

Tabla 7.16: Variación en el precio de venta de proteína, bajo el supuesto de demanda progresiva.

Variación	Precio [UF]	VAN [UF]	TIR (%)	PRC [años]
-50%	24,00	-55791,47	-8,8%	Más de 10
-40%	28,80	-34534,89	2,0%	Más de 10
-30%	33,60	-13278,31	10,4%	Más de 10
-20%	38,39	7978,26	17,6%	8
-10%	43,19	29234,84	24,1%	7
0%	47,99	50491,42	30,3%	6
10%	52,79	71748,00	36,1%	5
20%	57,59	93004,57	41,8%	4
30%	62,39	114261,15	47,4%	4
40%	67,19	135517,73	52,9%	3
50%	71,99	156774,31	58,3%	3

De modo que el límite del precio de venta de la proteína para que el proyecto sea rentable es de hasta un 80% del precio fijado originalmente (variación del -20%).

Así la variación del VAN y el TIR del proyecto en función del precio de venta de *rhBMP-2* queda reflejada en la Figura 7.5.

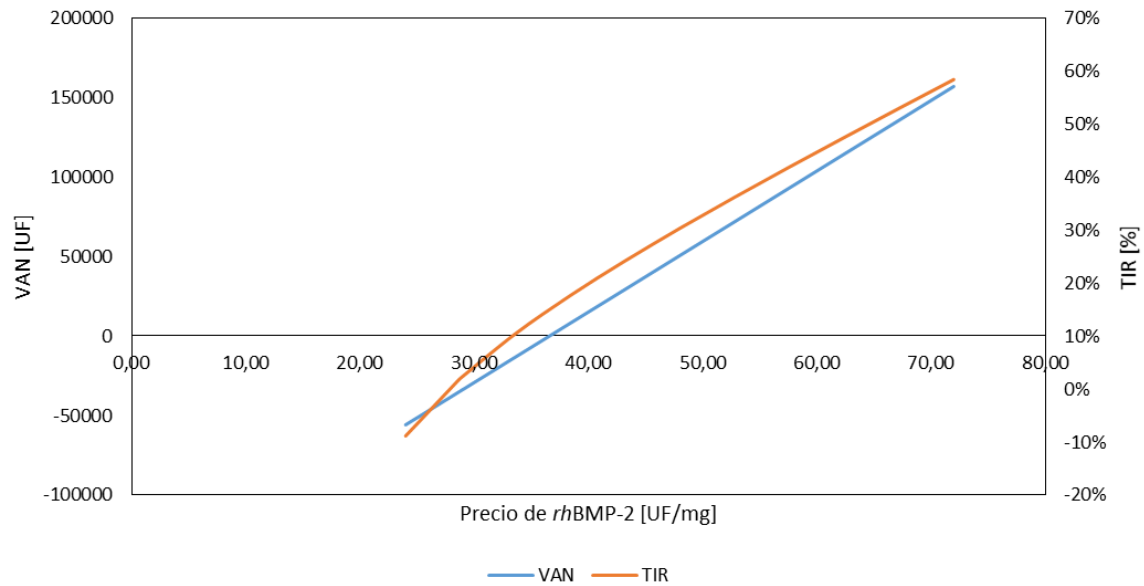


Figura 7.5: Análisis de sensibilidad para una variación del 50% en el precio de venta del producto, considerando Demanda Progresiva.

Entonces, se puede considerar que el proyecto es rentable pues la TIR finalmente, es mayor que la TRMA fijada y presenta un VAN positivo. Sin embargo, al analizar el período de retorno del capital, se observa que corresponde a un período mayor a la mitad de los años de proyección considerados en este trabajo, lo que debería ser considerado a la hora de invertir capital.

7.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 7

- Aduanas Chile. (s.f.). *Preguntas Frecuentes Importaciones*. Obtenido de Sitio web de Aduanas Chile, Gobierno de Chile: <http://www.aduana.cl/importaciones-de-productos/aduana/2007-02-28/161116.html>
- Aguas Andina S.A. (2014). *Tarifas: Aguas Andinas*. Obtenido de Sitio web de Aguas Andinas: <https://www.aguasandinas.cl/cliente/tarifas>
- ATCC. (2013). *CHO/dhFr-[CHO duk-, NOTE: dhfr refers to dihydrofolate reductase]* (ATCC CRL9096). Obtenido de ATCC Web site : <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-9096.aspx>
- Banco Central de Chile. (2014). *Base de Datos Estadísticos: Banco Central de Chile*. Recuperado el 2014, de Sitio web de Banco Central de Chile: <http://si3.bcentral.cl/Indicadoresiete/secure/Indicadoresdiarios.aspx>
- Chilectra S.A. (2014). Obtenido de Sitio web de Chilectra S.A.: http://www.chilectra.cl/wps/wcm/connect/0a30ad0044100acc96999e65fe3686ef/Tarifas_Su_ministro_ClientesRegulados_2014_01_01.pdf?MOD=AJPERES&Tipo=DOC
- Couper, J. R., Penney, W. R., Fair, J. R., & Wales, S. M. (2012). Cost of Individual Equipment. En J. R. Couper, W. R. Penney, J. R. Fair, & S. M. Wales, *Chemical Process Equipment* (págs. 731 - 741). Elsevier.
- INAPI. (s.f.). *Trámites y servicios - Consulta de Patentes: INAPI*. Obtenido de Sitio web INAPI, Gobierno de Chile: <http://ion.inapi.cl:8080/Patente/ConsultaAvanzadaPatentes.aspx>
- Indecopi, Perú. (s.f.). Obtenido de Sitio web de Indecopi: Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual: <http://www.indecopi.gob.pe/0/home.aspx?PFL=0>
- INPI, Argentina. (s.f.). Obtenido de Sitio web de INPI, Instituto Nacional de la Propiedad Industrial: <http://www.inpi.gov.ar/>
- Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. (s.f.). *Patentes de Invención*. Obtenido de Sitio web de Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual: <http://www.propiedadintelectual.gob.ec/patentes/>
- Ministerio de Educación, Gobierno de Chile. (2013). *Buscador de Empleabilidad e Ingresos: mifuturo.cl*. Obtenido de mifuturo.cl: <http://mifuturo.cl/index.php/futuro-laboral/buscador-por-carrera>
- Peters, M. S., & Timmerhaus, K. D. (1991). Cost Estimation. En M. S. Peters, & K. D. Timmerhaus, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers* (págs. 150 - 216). McGraw-Hill, Inc.
- Sapag, N., & Sapag, R. (1991). *Preparación y Evaluación de Proyectos* (Segunda ed.). McGraw-Hill.

SENAPI, Bolivia. (s.f.). Obtenido de Sitio web de SENAPI, Servicio Nacional de Propiedad Intelectual:
<http://www.senapi.gob.bo/index.asp>

Servicio de Impuestos Internos. (s.f.). *Sistema de Impuesto a la Renta Chileno*.

Servicio de Impuestos Internos . (2003). *Nueva Tabla de Vida Útil: Servicio de Impuestos Internos*.
Obtenido de SII Servicio de Impuestos Internos:
http://www.sii.cl/pagina/valores/bienes/tabla_vida_enero.htm

Servicio de Impuestos Internos. (2013). *Impuesto de Primera Categoría (Impuesto a las utilidades): Servicio de Impuestos Internos*. Obtenido de Sitio web de Servicio de Impuestos Internos :
http://www.sii.cl/portales/inversionistas/imp_chile/impuesto_primera.htm

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 DISCUSIÓN

Realizado un extenso trabajo de revisión bibliográfica se concluye que hay bastante información sobre la proteína *rhBMP-2* disponible y contradictoria. Por un lado se exponen los beneficios de su uso, aunque también se menciona que no existe clara evidencia de ello, e incluso podría ser nocivo. Es por esto, que el tema importante de discusión que interesa en este proyecto concierne a efectos reales que tiene el uso de *rhBMP-2* en las aplicaciones aprobadas. Sobre todo, después de lo sucedido con la aplicación en columna (ALIF), donde finalmente el informe emitido por la Universidad de Yale en colaboración con OHSU y la Universidad de York (ver Capítulo 2) concluye que los beneficios del tratamiento con *rhBMP-2* no serían significativamente mayores a los que ya se obtiene con el uso de autoinjerto. Es de gran importancia considerar que ese análisis fue realizado sólo para la aplicación en columna, lo que no necesariamente se correlacionaría con la realidad de las otras aplicaciones; sin embargo se debe tener en cuenta que luego del revuelo que significó para el mundo de la medicina de columna, se ha generado un ambiente de desconfianza hacia el producto, y es muy probable que se realicen estudios similares verificando las demás aplicaciones aprobadas.

Es importante destacar que al tratar con un mercado relacionado a la salud, que si bien se desarrolla en el ámbito científico es bastante subjetivo, la confianza del médico y del paciente es de fundamental importancia y difícil de adquirir, mayor aún de recuperar. Esto último debido que al tratarse de la salud los estándares de calidad son mucho más altos y el riesgo, sobre todo si implica un costo mayor, no es muy considerado. De esa manera, el ambiente de incertidumbre creado alrededor del real efecto de la proteína no sería beneficioso para el proyecto.

Otro aspecto que se debe mencionar es la matriz utilizada para transportar la proteína, ya que si bien no es parte de este proyecto, sí está directamente relacionado con él. Esto es debido a que la única matriz aprobada para las aplicaciones de esta proteína se encuentra patentada y es comercializada por la misma empresa encargada de la venta de la *rhBMP-2*, por lo que es poco probable que pueda

requerir del producto fabricado en este proyecto. Así, la falta de disponibilidad de una matriz alternativa limitaría la aplicación y por ende la venta del producto presentado.

Finalmente, si todo lo anterior lograra ser solucionado, es necesario prestar atención a la evaluación económica del proyecto, que si bien resulta ser rentable presentando un TIR mayor a la TRMA fijada y un VAN positivo, posee un período de retorno de capital superior a la mitad de la vida del proyecto evaluado (aunque se sabe que la duración real debiera ser mayor), y el riesgo asociado al éxito del proyecto radica más bien en el mercado y en la tecnología asociada a los soportes. Es por esto que a pesar de los aspectos positivos expuestos en el análisis de sensibilidad sobre la capacidad de variaciones de precio y aún considerarse rentable, la pregunta que se debe contestar realmente es si vale o no el esfuerzo y el riesgo de realizar esta inversión para obtener el margen de ganancia especificado.

8.2 CONCLUSIONES

Presentada la información y estableciendo el estado del arte del proyecto, es necesario seguir recabando información que pueda publicarse en los próximos años para determinar finalmente desde el punto de vista comercial, si la proteína *rhBMP-2* sigue siendo un producto de interés médico o es reemplazada por otra alternativa.

Desde el punto de vista de mercado, se establece un mercado pequeño, creciente pero fluctuante. Considerando la venta en Chile, Bolivia, Ecuador, Perú y Argentina se alcanza un mercado y demanda lo suficientemente robusto para pretender abarcar el 35% del mismo definiendo una capacidad productiva anual de la planta de 1537 [mg *rhBMP-2*].

En cuanto a la perspectiva técnica, es totalmente factible instalar una planta de las características propuestas en este proyecto, tanto tecnológica como operacionalmente. Se cuenta con acceso a equipamiento y profesionales adecuados para llevar a cabo el proceso; proponiéndose la utilización de una etapa de producción principalmente desechable.

En términos de rentabilidad, la evaluación económica entrega un resultado favorable en el que el mayor factor de influencia corresponde al valor de venta de la proteína. Sin embargo, al considerar el escenario de inserción del producto en el mercado a través de la demanda progresiva y sensibilizando el precio, el proyecto rápidamente cambia su rentabilidad. Si bien sigue siendo una opción de negocio, se encuentra bastante limitado por la incertidumbre de eventos futuros, con lo que podría ser considerado como una inversión riesgosa.

Así y debido a recientes eventos relacionados a la seguridad de la aplicación de proteína, la factibilidad de este proyecto se ve fundamentalmente condicionada por el mercado disponible.

8.3 RECOMENDACIONES

En primer lugar, se recomienda realizar un estudio económico más detallado en los países objetivos de mercado, con el fin de conocer más a cabalidad las características de cada uno de ellos y establecer de forma más acertada una potencial demanda de *rhBMP-2*.

Por otro lado, se piensa conveniente realizar investigaciones sobre las condiciones de producción de la proteína, su purificación y posibles nuevas aplicaciones, con el objetivo de proporcionar alguna innovación que resulte interesante. Además se aconseja incluir una línea de investigación sobre la matriz en la que se dispone la solución con *rhBMP-2*, para aportar un producto alternativo que no limite las condiciones de venta de la misma proteína, sujetas al medio de aplicación y que actualmente está protegido por patente.

Por último, se requiere evaluar y revisar constantemente las publicaciones acerca de las aplicaciones de *rhBMP-2* con el fin de evitar situaciones de error de estimación de demanda como lo sucedido con los casos ALIF.

CAPÍTULO 9

NOMENCLATURA

NOMENCLATURA		
Símbolo	Significado	Unidades
A	Área de filtración	[m ²]
a	Área por unidad de volumen	[1/cm]
a	Días de alimentación con Va de medio	[d]
C*	Concentración de oxígeno al equilibrio	[mg/mL]
C _L	Concentración de oxígeno disuelto en el medio	[mg/mL]
D	Difusividad en agua (a 25[°C])	[cm ² /s]
D	Tasa de dilución	[1/d]
E	Tasa de absorción	-
F	Flujo volumétrico	[L/h]; [L/s]; [m ³ /h]
F/V	Tasa específica de aireación	[vvm]
HTU	Altura de una unidad de transferencia	[cm]
J	Flux	[L/m ² ·h]
k _L	Coeficiente de transferencia de masa	[cm/h]
L	Número de lotes por año	-
L	Largo de la columna	[cm]
M	Mercado que se requiere abarcar	[mg BMP2]
M _r	Masa molecular relativa del soluto	[g/mol]; [kDa]
N	Velocidad de agitación	[rps]
N	Número de platos	-
n	Número de lotes por año	-
Na	Requerimientos de aire	[mol O ₂ /L/h]
N _p	Número de potencia	-
NTU	Número de unidades de transferencia	-
P	Presión	[atm]; [Pa]
P	Potencia	[W]
p	Período de perfusión	[d]
P	Concentración de producto	[mg/L]
Q	Calor	[kcal]
q _{BMP}	Productividad específica de rhBMP-2	[mgBMP/mg cél · d]
q _{O2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno	[mg O ₂ /mg cél/h]
R	Rendimiento global de etapas de recuperación y purificación	-
Re	Número de Reynolds	-

NOMENCLATURA		
Símbolo	Significado	Unidades
s	Factor de seguridad	-
S	Concentración de sustrato	[mg/L]
T	Temperatura	[°C]; [K]
t	Tiempo	[h]
V	Volumen de estanque	[m ³]; [L]
V	Volumen de solvente a tiempo t	[L]
v	Velocidad superficial	[cm/h]
Va	Volumen de agua preparado para "a" días	[L]
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	[mg/mL·s]
Vmagua	Volumen anual de agua para medio de cultivo	[L]
Vo	Volumen de solvente en el peak del perfil cromatográfico	[L]
VTO	Velocidad de transferencia de oxígenos	[mg/mL·s]
X	Concentración de biomasa	[mg/mL]
Xt	Concentración de biomasa	[mg/mL]
y	Concentración de proteína en tiempo t	[mg/mL]
yA	Concentración de proteína en alimentación	[mg/mL]

NOMENCLATURA GRIEGA		
Símbolo	Significado	Unidades
α	Fracción de recirculación	-
ρ	Densidad del fluido	[g/mL]
μ	Viscosidad dinámica de solución	[kg/m·s]
η	Rendimiento global de etapas de recuperación y purificación	-
η	Eficiencia del motor	-
μ	Velocidad específica de crecimiento celular	[1/d]
μ_d	Velocidad específica de muerte celular	[1/d]
k_d	Velocidad específica de muerte celular máxima	[1/d]
$\mu_{\max}$	Velocidad específica de crecimiento celular máxima	[1/d]

APÉNDICES

ÍNDICE DE APÉNDICES

APÉNDICE A.....	1
A.1 EJEMPLOS DE CÁLCULO DE CASOS ALIF, OTF E INJERTOS ORALES	1
A.1a Ejemplo de cálculo ALIF:	1
A.1b Ejemplo de cálculo OTF:	2
A.1c Ejemplo de cálculo injertos maxilofaciales:	3
A.2 CASOS ALIF, OTF Y DE INJERTOS ORALES ANUALES ESTIMADOS.....	4
A.2a Casos ALIF.....	4
A.2b Casos OTF.....	5
A.2c Casos de elevaciones de seno y aumentos alveolares	5
APÉNDICE B.....	6
B.1 INFORMACIÓN COMERCIAL DE LA LÍNEA CELULAR	6
B.2 INFORMACIÓN COMERCIAL DEL MEDIO DE CULTIVO	8
APÉNDICE C	9
C.1 GRÁFICO DE RUSHTON: NÚMERO DE POTENCIAS VERSUS NÚMERO DE REYNOLDS	9
C.2 VALORES TÍPICOS DE NÚMERO DE POTENCIA.....	10
C.3 CÁPSULA DE FILTRACIÓN OPTICAP® XL 2	11
C.4 GRÁFICOS DE PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE CASSETTES PELLICON® 2	13
C.5 TEORÍA DISEÑO DE CROMATOGRAFÍAS	14
C.6 EQUIPO CROMATOGRÁFICO ÄKTApilot.....	18
C.7 DETERMINACIÓN DEL REQUERIMIENTO DE AGUA TIPO I PARA TAMPONES	19
C.8 CLASIFICACIÓN DE SALAS LIMPIAS	21
C.9 CÁLCULO DEL CONSUMO ANUAL DE AGUA Y ENERGÍA	22
C.9a Consumo anual de agua	22
C.9b Consumo anual de electricidad	23
C.10 RELACIONES Y ECUACIONES BÁSICAS.....	25
C.10a Cálculo de velocidad volumétrica [ml/min] a partir de velocidad lineal [cm/h] para las cromatografías	25
C.10b Determinación de potencia	25
APÉNDICE D.....	26
D.1 TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)	26
D.2 CÁLCULO COSTO ESTANQUES E-1, E-2, E-3 Y E-4	28
D.3 COSTOS DE EQUIPOS Y MATERIALES.....	29
APÉNDICE E	30
E.1 PATENTE: MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA	30

APÉNDICE A

A.1 EJEMPLOS DE CÁLCULO DE CASOS ALIF, OTF E INJERTOS ORALES

A.1a Ejemplo de cálculo ALIF:

Para el cálculo de la cantidad de procedimientos ALIF que podrían llevarse a cabo en Chile, se cuenta con los siguientes datos:

- Cantidad de ALIF realizado en UK (en 2006): 1000
- Población de UK en 2006: 53.763.000

Luego el porcentaje de la población de Reino Unido que se sometería a procedimiento ALIF es de 0,00186%

Así, el número de ALIF en un año “i” suponiendo cualquiera y en cualquier país correspondería a:

$$(n^{\circ} ALIF)_i = (n^{\circ} Hab)_i \cdot \frac{0,00186}{100} \left(\frac{n^{\circ} ALIF}{n^{\circ} Hab} \right) \quad (Ec. A1)$$

Donde,

- $(n^{\circ} ALIF)_i$: número de ALIF que se realizarían durante el año “i”
- $(n^{\circ} de Hab)_i$: número de habitantes entre 20 y 64 años en el año “i”

De esta forma se calcula la cantidad de ALIF para el resto de los años considerados en el estudio de mercado.

Luego, para determinar la cantidad de ALIF que se asociarían a personas afiliadas a cada sistema previsional, se define que el porcentaje de habitantes cubiertos por cada sistema es:

FONASA: 74%

ISAPRE: 16,5%

Otro: 9,5%

Luego,

$$(n^{\circ} ALIF)_{FONASA_i} = (n^{\circ} ALIF)_i \cdot 0,74 \quad (Ec. A2)$$

$$(n^{\circ} ALIF)_{ISAPRE_i} = (n^{\circ} ALIF)_i \cdot 0,165 \quad (Ec. A3)$$

$$(n^{\circ} ALIF)_{Otros_i} = (n^{\circ} ALIF)_i \cdot 0,095 \quad (Ec. A4)$$

Donde,

- $(n^{\circ} \text{ ALIF})_{\text{FONASA}(i)}$: número de ALIF que se realizarían durante el año “i” asociadas a FONASA.
- $(n^{\circ} \text{ ALIF})_{\text{ISAPRE}(i)}$: número de ALIF que se realizarían durante el año “i” asociadas a ISAPRE.
- $(n^{\circ} \text{ ALIF})_{\text{Otros}(i)}$: número de ALIF que se realizarían durante el año “i” asociadas a otras previsiones.

Luego para definir la cantidad de ALIF según previsión considerada en los casos pesimista, optimista y demanda escogida, sea aplica el porcentaje definido en cada uno de esos casos al número de ALIF correspondiente (esto para cada uno de los años considerados) de forma similar a las ecuaciones Ec. A2, Ec. A3 y Ec. A4.

A.1b Ejemplo de cálculo OTF:

Por otro lado, para definir la cantidad de OTF grados IIIA y IIIB (IIIA/B) se tienen los siguientes datos:

- Cantidad OTF IIIA/B en 100.000 habitantes: 2,8

Luego,

$$(n^{\circ} \text{ OTF IIIA/B})_i = (n^{\circ} \text{ Hab})_i \cdot \frac{2,8 \text{ OTF IIIA/B}}{100.000 \text{ Hab}} \quad (\text{Ec. A5})$$

Donde,

- $(n^{\circ} \text{ OTF IIIA/B})_i$: número de OTF grado IIIA y IIIB que se realizarían durante el año “i”
- $(n^{\circ} \text{ de Hab})_i$: número de habitantes entre 20 y 64 años en el año “i”

Luego, para establecer la cantidad de OTF IIIA/B anuales (por año i) según el tipo de previsión, se repite el cálculo realizado para el caso de ALIF, utilizando las ecuaciones Ec. A2, Ec. A3 y Ec. A4 según

corresponda; y del mismo modo se repite el procedimiento utilizado en el caso de ALIF para establecer los casos pesimista, optimista y demanda para las OTF.

A.1c Ejemplo de cálculo injertos maxilofaciales:

Para el caso de los injertos a aplicar en elevaciones de seno maxilar y aumentos alveolares, el procedimiento de cálculo se ejemplifica a continuación, basándose en los presentados en la Tabla A.1:

Tabla A.1: Datos utilizados en el cálculo del número de injertos maxilofaciales.

índice	[%]	Referencia
Personas que sufren de pérdida de piezas dentales.	80	(Gobierno de Chile, 2012)
Personas con pérdida de piezas dentales que buscan tratamiento.	7,5	(Straumann, 2012)
Personas que buscan tratamiento que son realmente tratadas.	50	(Straumann, 2012)
Personas tratadas que requieren Implante.	15	(Straumann, 2012)
Implantes que requieren injerto.	25	(Straumann, 2012)

Utilizando los datos de la Tabla A.1 el cálculo que entrega la cantidad total de injertos considerada en el estudio de mercado es:

$$(n^{\circ} \text{ Injertos})_i = (n^{\circ} \text{ Hab})_i \cdot \left(\frac{80}{100} \frac{7,5}{100} \frac{50}{100} \frac{15}{100} \right) \left(\frac{n^{\circ} \text{ Imp}}{n^{\circ} \text{ Hab}} \right) \cdot \frac{25}{100} \left(\frac{n^{\circ} \text{ Injertos}}{n^{\circ} \text{ Imp}} \right) \quad (\text{Ec. A6})$$

Donde,

- $(n^{\circ} \text{ Injertos})_i$: número de injertos que se realizarían durante el año “i”
- $(n^{\circ} \text{ de Hab})_i$: número de habitantes entre 20 y 64 años en el año “i”

Luego, al igual que en los caso anteriores, se repite el procedimiento realizado para determinar la cantidad de injertos que estarían asociados a personas de cada uno de los sistema de previsión; utilizando las ecuaciones Ec. A2, Ec. A3 y Ec. A4 según corresponda. Así mismo se determina la cantidad de casos por año bajo los escenarios pesimista, optimista y de demanda; con la única excepción de la previsión FONASA para la que se utiliza una cantidad de 1500 implantes como referencia de cálculo.

A.2 CASOS ALIF, OTF Y DE INJERTOS ORALES ANUALES ESTIMADOS

A.2a Casos ALIF

Año	Casos ALIF por país				
	Chile	Bolivia	Ecuador	Perú	Argentina
2013	19	4	7	12	47
2014	20	4	7	12	48
2015	20	4	7	12	48
2016	20	4	7	12	49
2017	20	4	7	13	49
2018	21	4	7	13	50
2019	21	4	8	13	50
2020	21	5	8	13	51
2021	21	5	8	14	51
2022	22	5	8	14	52
2023	22	5	8	14	52

A.2b Casos OTF

Año	Casos OTF por país				
	Chile	Bolivia	Ecuador	Perú	Argentina
2013	22	6	10	18	54
2014	23	6	11	18	55
2015	23	6	11	19	56
2016	23	6	11	19	56
2017	23	6	11	19	57
2018	24	7	11	19	57
2019	24	7	11	20	58
2020	24	7	11	20	59
2021	25	7	12	20	59
2022	25	7	12	21	60
2023	25	7	12	21	60

A.2c Casos de elevaciones de seno y aumentos alveolares

Año	Casos Maxilofaciales por país				
	Chile	Bolivia	Ecuador	Perú	Argentina
2013	753	114	206	351	982
2014	764	117	209	357	993
2015	776	119	211	363	1003
2016	788	122	214	369	1014
2017	799	125	217	375	1025
2018	811	128	219	381	1036
2019	822	130	222	387	1047
2020	834	133	225	393	1058
2021	846	136	227	399	1069
2022	857	139	230	405	1080
2023	869	142	233	412	1091

APÉNDICE B

B.1 INFORMACIÓN COMERCIAL DE LA LÍNEA CELULAR



Product Sheet

**CHO/dhFr- [CHO duk-,
NOTE: dhfr refers to
dihydrofolate reductase]
(ATCC® CRL-9096™)**

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

Iscove's modified Dulbecco's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and supplemented with 0.1 mM hypoxanthine, 0.016 mM thymidine, 0.002mM Methotrexate (Amethepterin) and 10% fetal bovine serum

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: CHO/dhFr- [CHO duk-, NOTE: dhfr refers to dihydrofolate reductase] (ATCC® CRL-9096™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Organism: *Cricetulus griseus*, hamster, Chinese
Tissue: ovary
Gender: female
Morphology: epithelial
Growth Properties: adherent



Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.



SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.



Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.



Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 ml complete culture medium and spin at approximately 125 x g for 5 to 10 minutes.
4. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in an appropriate amount of fresh growth medium.
5. Transfer the cells to an appropriate size vessel. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
6. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



ATCC

Product Sheet

**CHO/dhFr- [CHO duk-,
NOTE: dhfr refers to
dihydrofolate reductase]
(ATCC® CRL-9096™)**

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

Iscove's modified Dulbecco's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and supplemented with 0.1 mM hypoxanthine, 0.016 mM thymidine, 0.002mM Methotrexate (Ametopterin) and 10% fetal bovine serum

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: CHO/dhFr- [CHO duk-, NOTE: dhfr refers to dihydrofolate reductase] (ATCC® CRL-9096™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor



Subculturing Procedure

Volumes are given for a 75 cm² flask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes.

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
6. Incubate cultures at 37°C.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 to 1:8 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week



Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures. Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [05/22]

B.2 INFORMACIÓN COMERCIAL DEL MEDIO DE CULTIVO



Product Sheet

**Iscove's Modified
Dulbecco's Medium (IMDM)
(ATCC® 30-2005™)**

Please read this FIRST

Storage Temp.
**Store medium at
2°C to 8°C in the
dark when not in
use.**

Biosafety Level
1

**Description**

Product Description: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) contains 4 mM L-glutamine, 4500 mg/L glucose, and 1500 mg/L sodium bicarbonate.

Volume: 500 mL

**Directions for Use****Formulation**

Contains 4 mM L-glutamine, 4500 mg/L glucose, and 1500 mg/L sodium bicarbonate **NOTE:** This reduced level of sodium bicarbonate (NaHCO₃, 1.5 g/L) is intended for use in a 5% CO₂ in air. Additional sodium bicarbonate may be required for use in incubators containing higher percentages of CO₂.

Quality Control Specifications

Sterility tests are performed on each lot of medium using current USP methods. Each lot of medium is also checked for its ability to support the growth of several different cell lines using both sequential subcultures and plating efficiencies. Additional test results are listed in the Certificate of Analysis.

Test*	Specification
pH	7.0 to 7.4
Osmolality	235 to 309 mOsm/kg
Sterility Testing	Pass
Endotoxin	≤ 0.5 EU/mL
Mycoplasma	Pass
Growth Promotion	Pass

*Please consult the Certificate of Analysis for lot-specific test results.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [05/01]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

APÉNDICE C

C.1 GRÁFICO DE RUSHTON: NÚMERO DE POTENCIAS VERSUS NÚMERO DE REYNOLDS

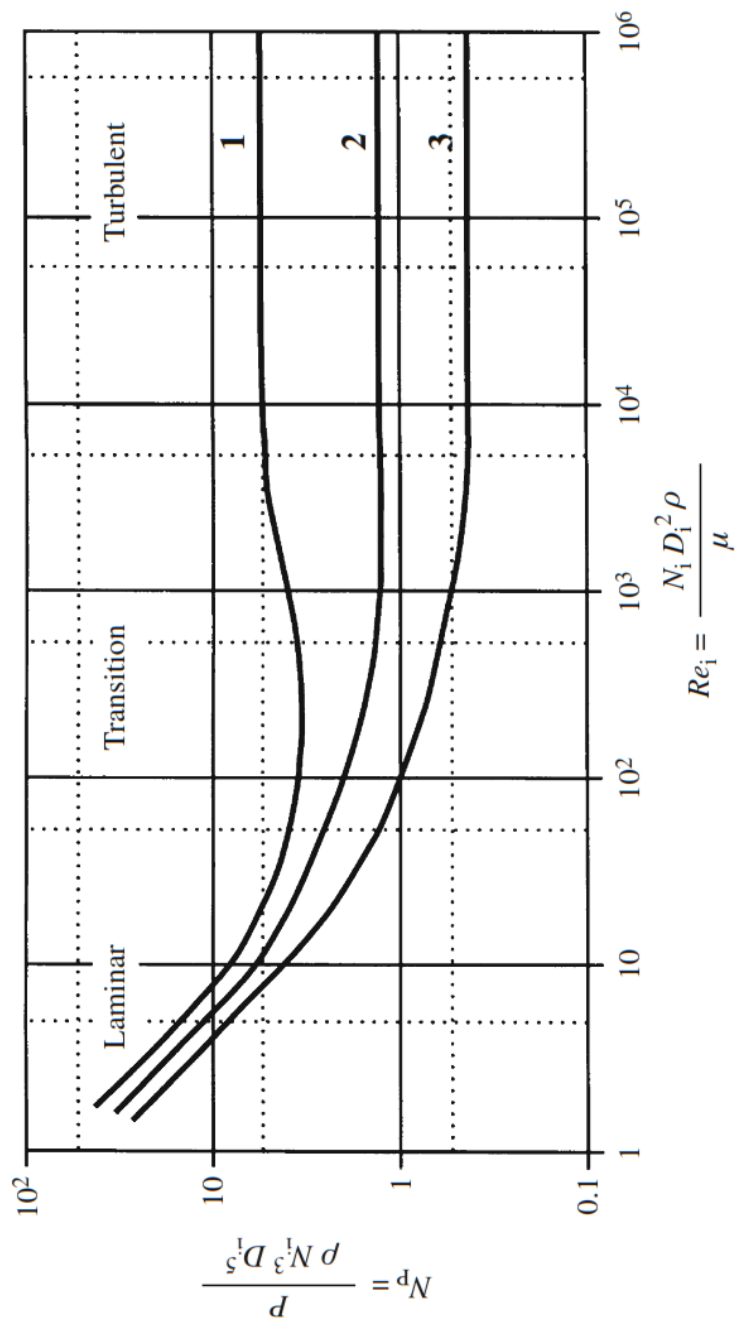


Figura C.1: Correlación entre el Número de Reynolds (Re) y el Número de Potencia (N_p) para impulsos en fluidos sin gases. (1) Turbina Rushton; (2) Turbina de Paletas Inclinadas (PBT); (3) Hélice Marina. (Doran, 2013, Bioprocess Engineering Principles)

C.2 VALORES TÍPICOS DE NÚMERO DE POTENCIA

Tabla C.2: Números de potencia de varios impulsores bajo condiciones turbulentas con cuatro deflectores estándar. (Paul, Atiemo-Obeng & Kresta, 2003, Handbook of Industrial Mixing)

Impeller Type	N_p
Concave- or hollow-blade turbine	4.1
Ekato MIG—3 impellers, $D/T = 0.7$	0.55
Ekato Intermig—2 impellers, $D/T = 0.7$	0.61
High-shear disk at $Re = 10\ 000$	0.2
	(lower for lower Re)
Lightnin A310	0.3
Chemineer HE3	0.3
The following are all for $D = T/3$, $C = T/3$, and blade width $W = D/5$:	
45°PBT; 4 blades	1.27
45°PBT; 6 blades	1.64
Marine propeller (1.0 pitch)	0.34
Marine propeller (1.5 pitch)	0.62
Smith or concave- or hollow-blade with 6 blades	4.4

C.3 CÁPSULA DE FILTRACIÓN OPTICAP® XL 2

Tabla C.3: Características cápsulas Opticap® XL 2, 4, 5y 10. Obtenido de Data Sheet Sterilizing-grade Durapore® 0.1 µm and 0.22 µm Hydrophilic Filters de Merck Millipore.

Specifications (continued)

	Opticap® XL 2	Opticap® XL 4	Opticap® XL 5	Opticap® XL 10
Nominal Dimensions				
Maximum length:	14.2 cm (5.6 in.)	19.6 cm (7.7 in.)	21.6 cm (8.5 in.)	33.5 cm (13.2 in.)
Body diameter:	8.4 cm (3.3 in.)	8.4 cm (3.3 in.)	10.7 cm (4.2 in.)	10.7 cm (4.2 in.)
Filtration Area	0.09 m ² (0.93 ft ²)	0.19 m ² (2.09 ft ²)	0.35 m ² (3.7 ft ²)	0.69 m ² (7.4 ft ²)
Materials of Construction				
Filter membrane:	Hydrophilic PVDF			
Film edge:	Polypropylene			
Supports:	Polypropylene			
Structural components*:	Polypropylene			
Vent O-rings:	Silicone			
Vent/Drain	¼ in. hose barb with double O-ring seal			
Maximum Inlet Pressure	5.5 bar (80 psi) at 23 °C 2.8 bar (40 psi) at 60 °C 1.0 bar (15 psi) at 80 °C			
Maximum Differential Pressure				
Forward:	5.5 bar (80 psid) at 25 °C, 1.0 bar (15 psid) at 80 °C			
Reverse:	3.4 bar (50 psid) at 25 °C, intermittent			
Bubble Point at 23 °C				
0.1 µm:	≥ 4830 mbar (70.0 psig) air with water			
0.22 µm:	≥ 3450 mbar (50.0 psig) air with water			
Air Diffusion	Through a water wet membrane at ambient temperature:			
0.1 µm at 3.9 bar (56 psig):	≤ 3.5 cc/min	≤ 7.5 cc/min	≤ 10.0 cc/min	≤ 20.0 cc/min
0.22 µm at 2.8 bar (40 psig):	≤ 2.5 cc/min	≤ 5.5 cc/min	≤ 6.6 cc/min	≤ 13.3 cc/min
NVR Gravimetric Extractables	After autoclaving and a 24 hour soak in ASTM® Type 1 reagent grade water at controlled room temperature:			
	≤ 10 mg (XL 2)	≤ 10 mg (XL 4)	≤ 15 mg (XL 5)	≤ 25 mg (XL 10)
Oxidizable Substances	Meets the requirements of the USP Oxidizable Substances Test after a water flush of:			
	500 mL	500 mL	500 mL	1000 mL
Bacterial Endotoxin	Aqueous extraction contains < 0.5 EU/mL as determined by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test.			
Bacterial Retention	Quantitative retention of 10 ⁷ CFU/cm ² <i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC® 19146 per ASTM® methodology.			
Sterilization	May be autoclaved for 3 cycles of 60 minutes at 126 °C. (Cannot be steam sterilized in-line.)			
Good Manufacturing Practices	These products are manufactured in a facility which adheres to FDA Good Manufacturing Practices.			
Non-Fiber Releasing	Durapore® membrane meets the criteria for a "non-fiber releasing" filter as defined in 21 CFR 210.3 (b) (6).			
Component Material Toxicity	Component materials were tested and meet the criteria of the USP <88> Reactivity Test for Class VI Plastics. Sterilizing-grade Durapore® Filters meet the requirements of the current USP <88> Safety Test.			
Indirect Food Additive	The Durapore® membrane used in these products meets the FDA Indirect Food Additive requirements cited in 21 CFR 177.2910. All other component materials also meet the FDA Indirect Food Additive requirements - cited in 21 CFR 177-182.			

Opticap® XL Capsule Filters
Opticap® XL 2 Capsule Filters —
0.1 μm Hydrophilic Durapore® Membrane

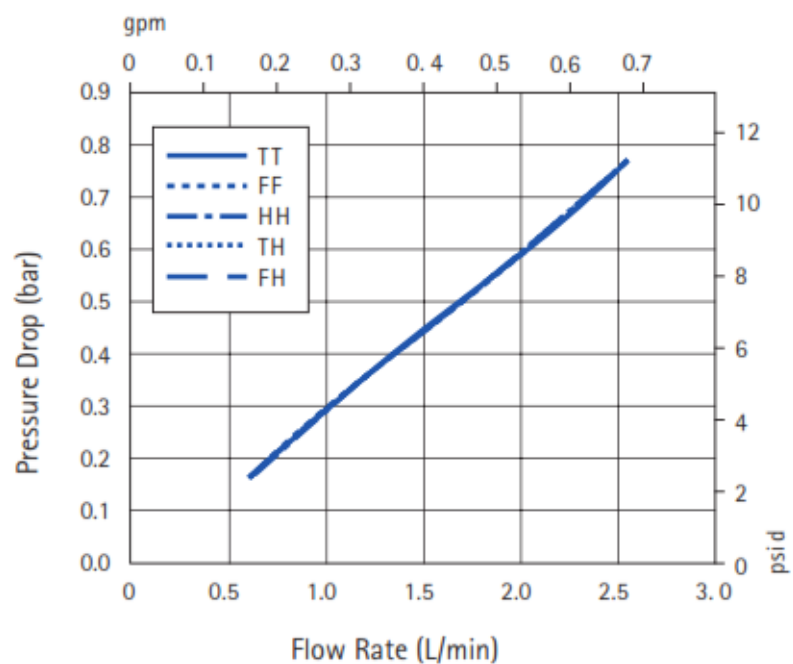


Figura C.3: Perfil de flujo para cápsula de filtración OptiCap® XL 2. Obtenido de Data Sheet Sterilizing-grade Durapore® 0.1 μm and 0.22 μm Hydrophilic Filters de Merck Millipore.

C.4 GRÁFICOS DE PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE CASSETTES PELLICON® 2

Improved Flux

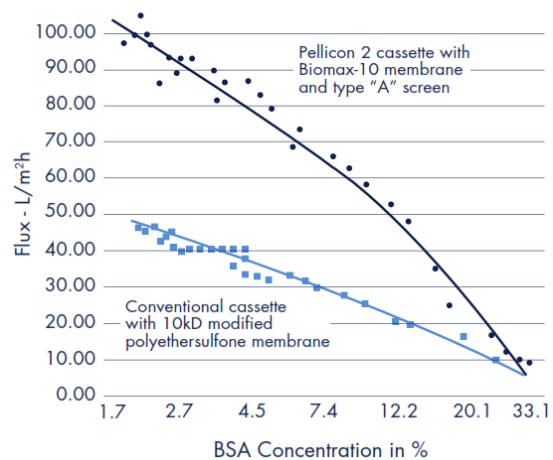


Figura C.4a: Prueba de desempeño de filtros Pellicon®2. Obtenido de Data Sheet Pellicon® 2 Filters and Holders de Millipore

Linear Scalability

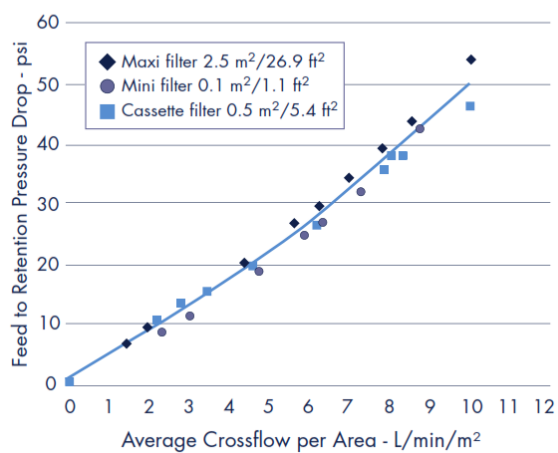


Figura C.4b: Caída de presión de filtros Pellicon®2 versus flujo promedio de solución 10% BSA Obtenido de Data Sheet Pellicon® 2 Filters and Holders de Millipore

C.5 TEORÍA DISEÑO DE CROMATOGRAFÍAS

Generalidades de diseño

Para el diseño de las columnas cromatográficas, dada la baja cantidad de proteína y a la falta de datos respecto a la interacción específica de la proteína *rhBMP-2* con los geles utilizados, se asume que se trabaja en la porción lineal de la isoterma de Langmuir que relaciona la concentración de soluto que se une a la fase estacionaria con la concentración del mismo soluto en fase móvil; y que existe un perfil Gaussiano en la cromatografía. De esta manera se trabajará utilizando la combinación de las teorías “Cinética” y “de Platos” para el diseño de cromatografías, de acuerdo a sus respectivas ecuaciones (Belter, Cussler, & Hu, 1988).

Por otro lado, dados los datos que se tienen de la proteína, los geles y la patente se realizará el diseño en primera instancia de la cromatografía de exclusión molecular y luego la cromatografía de interacción hidrofóbica de acuerdo a las teorías mencionadas.

Teoría Cinética:

Esta teoría considera una secuencia de etapas y el balance de cada etapa corresponde al siguiente (Belter, Cussler, & Hu, 1988):

$$\left[\begin{array}{c} \text{Acumulación de soluto} \\ \text{en líquido y adsorbente} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Dispersión de soluto} \\ \text{Entrada - Salida} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Convección de soluto} \\ \text{Entrada - Salida} \end{array} \right]$$

$$\varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} = E \frac{\partial^2 y}{\partial z^2} - v \frac{\partial y}{\partial z} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde,

ε : Fracción de vacío del lecho

q : Concentración por volumen de soluto

v : Velocidad superficial

E : Coeficiente de dispersión

y : Concentración en la solución

Dejando “ q ” en función de “ y ” y resolviendo la ecuación diferencial luego de algunos arreglos, se obtiene el largo queda definido por la ecuación Ec. 2

$$L = \int_0^L dz = \frac{v}{k \cdot a} \cdot \int_{y_A}^y \frac{dy}{(y - y^*)} \quad (Ec. 2)$$

con

$$HTU = \frac{v}{k \cdot a} \quad (Ec. 3)$$

$$NTU = \int_{y_A}^y \frac{dy}{(y - y^*)} \quad (Ec. 4)$$

Donde,

L: Largo de la columna [cm]

v: Velocidad superficial [cm/h]

k: Coeficiente de transferencia de masa [cm/h]

a: Área por unidad de volumen

y: Concentración en solución [mg/ml]

y*: Concentración en solución al equilibrio con la concentración en el adsorbente [mg/ml]

HTU: Altura de una unidad de transferencia [cm]

NTU: Número de unidades de transferencia

Por otro lado, para calcular los valores “k” y “a” se utilizan las ecuaciones Ec. 5 y Ec. 6 respectivamente (Belter, Cussler, & Hu, 1988).

$$k_L = 1,17 \cdot v \cdot \left(\frac{d_p \cdot v \cdot \rho}{\mu} \right)^{-0,42} \cdot \left(\frac{\mu}{D \cdot \rho} \right)^{-0,67} \quad (Ec. 5)$$

Donde,

d_p: Diámetro de partícula de gel [cm]

ρ: Densidad solución [g/ml]

μ: Viscosidad dinámica de solución [g/m·s]

D: Coeficiente de difusividad [cm²/s]

$$a = 6 \cdot \frac{(1 - \varepsilon)}{d_p} \quad (Ec. 6)$$

Donde,

d_p: Diámetro de partícula de gel [cm]

ε: Porosidad del lecho

Teoría de Platos:

Esta teoría considera una secuencia de etapas y el balance de cada etapa corresponde al siguiente (Belter, Cussler, & Hu, 1988):

$$\left[\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de soluto en líquido} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de soluto en adsorbente} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Entrada} \\ \text{de soluto} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Salida} \\ \text{de soluto} \end{array} \right]$$

$$\varepsilon V_s \frac{dy_n}{dt} + (1 - \varepsilon) V_s \frac{dq_n}{dt} = H(y_{n-1} - y_n) \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde,

ε : Fracción de volumen de líquido en la etapa

q_n : Concentración de soluto en el adsorbente

V_s : Volumen de la etapa

H : flujo de solvente

y_n : Concentración de soluto en el líquido de la etapa n

Asumiendo la isoterma lineal y luego de algunas modificaciones, la expresión de concentración corresponde a la 8.

$$y = \frac{y_A}{\sqrt{2\pi \cdot N}} \cdot \exp \left[-\frac{\left(\frac{V}{V_0} - 1 \right)^2}{\frac{2}{N}} \right] \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde,

y : Concentración de proteína en tiempo t

[mg/ml]

y_A : Concentración de proteína en alimentación

[mg/ml]

N : Número de platos

V : Volumen de solvente a tiempo t [l]

V_0 : Volumen de solvente en el peak del perfil cromatográfico [l]

Teoría Combinada:

Al resultar un poco complicado definir la concentración que podría estar al equilibrio (y^*) resulta complejo determinar el valor de NTU según la teoría cinética. Como solución a lo anterior, la Teoría Combinada permite igualar el número de platos teóricos (N) al número de unidades de transferencia (NTU), entregando una ecuación que permite calcular el largo de una columna cromatográfica como se puede observar en Ec. 9.

$$L = HTU \cdot N \quad (Ec. 9)$$

Utilizando las ecuaciones anteriores, se determina el número de platos teóricos (N) bajo la teoría de platos (Ec. 8) y se asume que equivale al número de unidades de transferencia (NTU); así, una vez obtenido el valor de HTU (por medio de Ec. 3,5 y 6), permite utilizar la teoría combinada (Ec.9) para calcular el largo de la columna cromatográfica.

C.6 EQUIPO CROMATOGRÁFICO ÄKTApilot

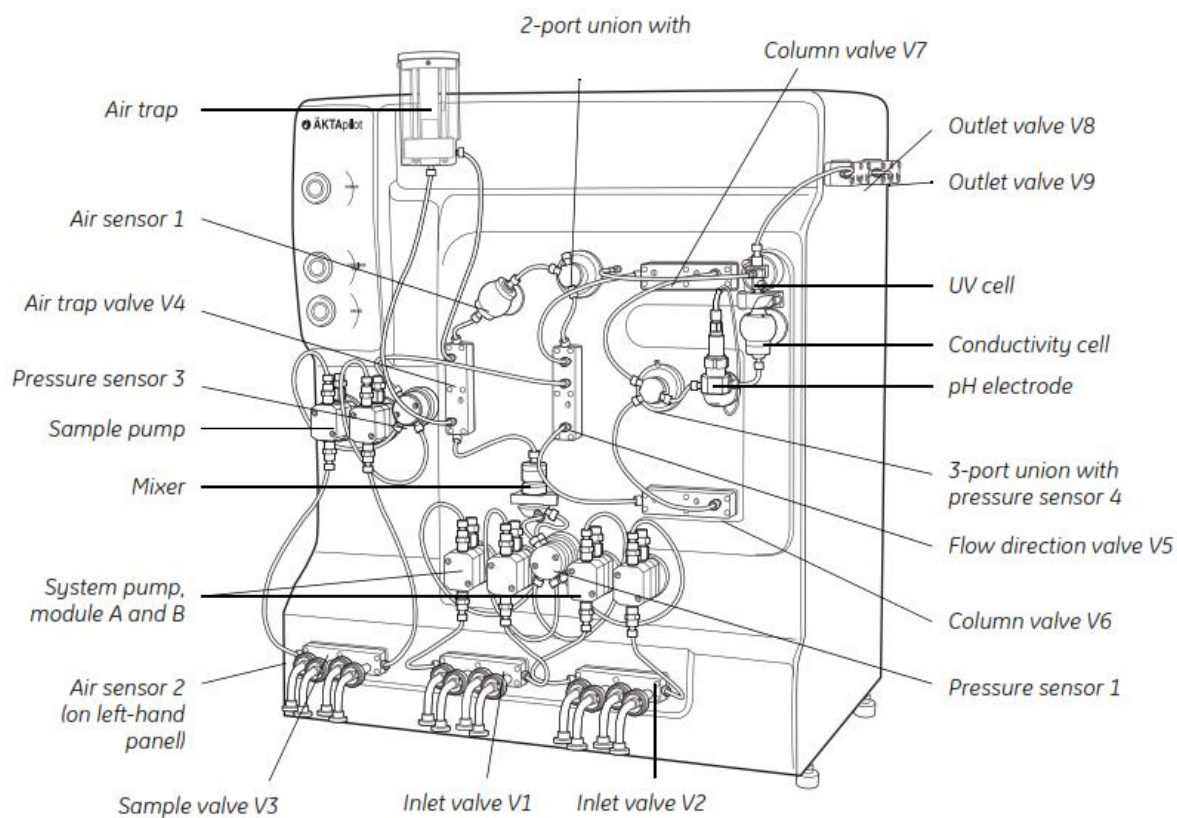


Figura C.6: Esquema de ÄKTApilot. Obtenido de GE Healthcare ÄKTApilot Instrument Handbook, 2007.

C.7 DETERMINACIÓN DEL REQUERIMIENTO DE AGUA TIPO I PARA TAMPONES

Para definir la cantidad de agua Tipo I requerida, es necesario conocer los requerimientos para la preparación de medio y de tampones utilizados en el proceso de purificación.

Respecto a la preparación de medio, dada la tasa de perfusión se conoce que se requerirían 62,5 [l/d].

Por otro lado, para la cantidad de agua destinada a la preparación de medios es necesario contar con los volúmenes de diseño y los volúmenes de columna (CV) recomendados en la patente US2013/0060012 A1, presentados en la Tabla C.7a.

Tabla C.7a: Volúmenes de las etapas de purificación HIC, DF y SEC.

Operación	Etapas	Volumen
HIC	Columna	3125 [ml]
	Equilibrado	3 CV
	Lavado	3 CV
	Elución	2 CV
DF	Volumen Eluyente	18,6 [l]
SEC	Columna	1041 [ml]
	Equilibrado	1 CV
	Elución	1 CV

Con los datos presentados en la Tabla C.7a, se conoce el volumen total de eluyente (tampón) requerido para la diafiltración (DF) según el diseño realizado en el Capítulo 5; sin embargo para ambas cromatografías es procedimiento para determinar el volumen total de tampón es el siguiente:

$$V_i = 2 \cdot V_c \quad (Ec. HIC)$$

Donde,

V_c : Volumen de columna

V_i : Volumen de etapa “i” (CV)

Así, por ejemplo, en el caso del volumen de tampón utilizado en la etapa de equilibrado de la HIC es:

$$V_{Eq_{HIC}} = 2 \cdot 3125 [ml] = 6250 [ml]$$

Se realiza el mismo cálculo con el resto de las etapas y luego el volumen total de agua destinado a la producción de tampones es la sumatoria de los volúmenes de tampón de cada etapa.

Tabla C.7b: Cantidad de agua Tipo I requerida para tampones.

Operación	Etapas	Volumen [l/d]
HIC	Equilibrado	9,38
	Lavado	9,38
	Elución	6,25
DF	Volumen Eluyente	18,60
SEC	Equilibrado	1,04
	Elución	1,04
Total		45,68

C.8 CLASIFICACIÓN DE SALAS LIMPIAS

Tabla C.8: Especificaciones para salas limpias clases A, B, C y D utilizadas en la industria farmacéutica. En “EC Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products” y (2003, P. Walsh, Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology).

Grade	Maximum permitted number of particles per m ³		Maximum permitted number of viable microorganisms per m ³ of clean room air
	0.5 µm particle diameter	5.0 µm particle diameter	
A	3 500	0	Statistically <1
B	3 500	0	5
C	350 000	2 000	100
D	3 500 000	20 000	500

C.9 CÁLCULO DEL CONSUMO ANUAL DE AGUA Y ENERGÍA

Los datos de tiempo considerados son presentados en la Tabla B.9a, además se considera que se realizan 6 lotes año.

Tabla 9a: Duración de etapas del proceso

Etapa	Duración [d]
Propagación 1 ^(a)	4
Propagación 2 ^(a)	7,5
Cultivo Lote	3
Cultivo Perfusión	51
Estado Estacionario ^(c)	11
Año laboral	335

^(a) Uso de shaker

^(b) Uso de agitador magnético

^(c) Días en que se alcanza el estado estacionario una vez iniciada la perfusión

C.9a Consumo anual de agua

Medio de Cultivo

$$Vm_{agua} = \left(\frac{Va \cdot p}{a} + Va \cdot s + V_L \right) \cdot n$$

Donde,

Vm_{agua} : Volumen anual de agua para medio de cultivo

Va : Volumen de agua preparado para “a” días (250 [l])

a: Días de alimentación con Va de medio (4 días)

p: Período de perfusión (51 días)

s: Factor de seguridad (veces en que se rechaza el medio)

V_L : Volumen de cultivo por lotes (25 [l])

n : Número de lotes por año

Tampones

Ver Apéndice C.7 y multiplicar por el del número de días de purificación en estado estacionario (40 días)

Agua Tipo II

Se estima que se rellenará el estanque E-1 de agua cada 3 días y se consideran los días totales de trabajo al año (335), ya que este tipo de agua se destina a limpieza de material.

C.9b Consumo anual de electricidad

En la Tabla C.9b se presentan todos los datos calculados para la determinación del consumo anual de electricidad.

La metodología de cálculo es la siguiente:

Se establecen las horas al día de funcionamiento de cada equipo utilizando los tiempos de duración de cada etapa establecidos en el Capítulo 5; luego se multiplican estas horas por los días de duración de cada etapa por lote de producción (ver Tabla C.9a). Finalmente se multiplica ese valor por el número de lotes realizados al año y por el número de equipos que estará en funcionamiento.

$$E \left[\frac{kWh}{año} \right] = E \left[\frac{kW}{equipo} \right] \cdot h \left[\frac{h}{día} \right] \cdot d_e \left[\frac{día}{etapa} \right] \cdot e \left[\frac{etapas}{lote} \right] \cdot l \left[\frac{lotes}{año} \right] \cdot n[equipos]$$

Tabla C.9b: Consumo anual de electricidad

Etap	Nombre	Equipo	Potencia [W]	Tiempo funcionamiento [h/d]	Tiempo funcionamiento [h/lot]	Tiempo funcionamiento [h/año]	Cantidad de equipos en funcionamiento	Consumo [kWh/año]
Propagación	-	Shaker	200	24,00	96,00	576,00	1	115,20
	-	Agitador Magnético	800	24,00	180,00	1.080,00	1	864,00
Producción	E-3; E-4	Estanque Medio	200	1,50	78,00	468,00	2	187,20
	E-5; E-6	Estanque Flexel	300	24,00	1.224,00	7.344,00	2	4.406,40
Recuperación Y Purificación	R-1	Reactor	6389	24,00	1.296,00	7.776,00	1	49.680,86
	UF-1	Equipo UF	230	0,25	12,75	76,50	1	17,60
	C-1	Equipo HIC	800	2,42	123,25	739,50	1	591,60
Equipos Auxiliares	UF-2	Equipo DF	230	1,00	51,00	306,00	1	70,38
	C-2	Equipo SEC	800	0,83	42,50	255,00	1	204,00
	W-1; W-2	Purificador Agua	360	24,00	1.320,00	7.920,00	2	5.702,40
	B-1; B-2; B-3; B-6	Bomba	506	0,25	13,00	78,00	4	157,87
	B-4; B-5	Bomba	208	1,50	78,00	468,00	2	194,69
TOTAL								62.192,20

C.10 RELACIONES Y ECUACIONES BÁSICAS

C.10a Cálculo de velocidad volumétrica [ml/min] a partir de velocidad lineal [cm/h] para las cromatografías

$$Vel. volumétrica = Vel. lineal \cdot \text{Área de flujo}$$

$$Q \left[\frac{ml}{min} \right] = \frac{Y \left[\frac{cm}{h} \right]}{60 \left[\frac{min}{h} \right]} \cdot \pi \frac{d^2}{4} [cm^2]$$

Donde,

Q: Velocidad volumétrica

Y: Velocidad lineal

d: Diámetro interno de la columna

C.10b Determinación de potencia

La potencia de un equipo puede ser determinada conociendo los datos de voltaje y amperaje requeridos, según la siguiente ecuación:

$$I = \frac{W}{E}$$

Donde,

I: Corriente eléctrica [A] E: Potencial eléctrico [V] W: Unidad de potencia eléctrica [W]

APÉNDICE D

D.1 TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)¹

El Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT)² es un sistema de "presentación" de solicitudes de patente, no un sistema de "concesión" de patentes.

El PCT es un tratado internacional administrado por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), que se celebró en una conferencia diplomática desarrollada en Washington, en Junio de 1970, entró en vigor el 24 de Enero de 1978 y comenzó a aplicarse el 01 de Junio de ese mismo año, con un primer grupo de 18 Estados contratantes, como un mecanismo alternativo al sistema tradicional de patentes, visto en el punto anterior.

En Chile, el Tratado entró en vigor el 02 de Junio del 2009. Actualmente son parte del Tratado 142 Estados.

Frecuentemente se considera que PCT marca el progreso más notable realizado en la cooperación internacional en el campo de las patentes de invención desde la adopción del propio Convenio de París. De hecho, se trata esencialmente de un tratado destinado a racionalizar y a poner bajo el signo de la cooperación, la presentación de solicitudes de patente, la búsqueda y el examen, así como la divulgación de la información técnica contenida en las solicitudes. PCT no dispone la concesión de "patentes internacionales": la tarea y la responsabilidad de la concesión de patentes compete de manera exclusiva a las oficinas de patentes de los países donde se busca la protección o de las Oficinas que actúan en nombre de esos países (las "Oficinas designadas"). PCT no entra en competencia con el Convenio de París, sino que lo complementa. En realidad, se trata de un acuerdo especial concertado en el marco del Convenio de París y que sólo está abierto a los Estados que ya son parte en dicho Convenio.

Objetivos

El principal objetivo de PCT es simplificar y hacer más eficaz y económico (desde el punto de vista de los usuarios del sistema de patentes y de las oficinas encargadas de administrarlo) el

¹ Información extraída del sitio web: www.inapi.cl, correspondiente al Instituto Nacional de Propiedad Intelectual, del Gobierno de Chile.

² Para ver la lista de Estados Contratantes del tratado visitar sitio web: http://www.wipo.int/pct/en/pct_contracting_states.html, disponible en: <http://www.wipo.int>.

procedimiento para solicitar en varios países la protección de las invenciones mediante patentes. Pero éste no es su único objetivo, PCT también tiene como parte de sus propósitos facilitar y acelerar el acceso de las industrias y de los demás sectores interesados a la información técnica relacionada con las invenciones, y ayudar a los países en desarrollo a acceder a la tecnología.

Además del cumplimiento de estos objetivos, la presentación a través de PCT presenta ventajas tanto para el inventor como para la industria, porque:

- Facilita el trámite de la presentación de una solicitud internacional de patente, ya que tiene requisitos de forma preestablecidos.
- Se postergan en 18 meses los gastos derivados del pago de las tasas nacionales, en comparación con el sistema tradicional.
- Incentiva la protección de las invenciones a nivel internacional, lo que redundará en un incremento del desarrollo científico, tecnológico y económico del país.
- Crea, posterior a la etapa de publicación internacional, una verdadera "ventana tecnológica", ya que todo interesado puede ingresar a la base de datos PATENTSCOPE® de la OMPI (www.wipo.int/pctdb/es/) y encontrar de forma gratuita el documento de patente completo, además del contenido de los informes de búsqueda internacional. El material publicado constituye una valiosa fuente de información sobre los últimos adelantos tecnológicos, que puede ser muy útil para estimular la actividad inventiva a nivel nacional y/o potenciales licencias.
- Abre una real posibilidad a la transferencia de información tecnológica con distintas naciones, especialmente en favor de los países en desarrollo.
- Permite al solicitante evaluar con una mayor certeza, sobre la base del informe de Búsqueda Internacional y la opinión escrita, las probabilidades y perspectivas de patentabilidad de su invención.
- El solicitante cuenta con la facultad de modificar la solicitud internacional durante el Examen Preliminar Internacional para ajustarla y ponerla en orden, antes de su tramitación por las distintas Oficinas de Patentes elegidas.

D.2 CÁLCULO COSTO ESTANQUES E-1, E-2, E-3 Y E-4

Utilizando la metodología (b) nombrada en la subsección 7.1.1, se establece el valor de los estanques por medio de la ecuación Ec. presentada para estanques de almacenamiento, obtenida en bibliografía (Couper, Penney, Fair & Wales, 2012). Es importante mencionar que si bien E-2 cuenta con un sistema de agitación, no se encontró la ecuación para este tipo de estanques, optando por utilizar la misma ecuación para ambos estanques.

$$C = 1,218 \cdot F_M \cdot \exp[2,631 + 1,3673 \cdot \ln(V) - 0,06309 \cdot \ln(V)^2]$$

Donde,

C: Costo del equipo

F_M : Relación de estimación de costo igual a 2,7 para acero inoxidable 316

V: Volumen del estanque

Luego, dado que este valor corresponde al año 2003, se realiza la corrección del costo obtenido utilizando el indicador CEPCI del año 2003 y 2013 (valor pre-eliminar publicado en abril de 2013), los resultados se presentan en la Tabla D.2

Tabla D.2: Valores FOB de estanques

Equipo	Capacidad [l]	F_M	Costo F.O.B [USD]	CE 2003	CE 2013	Costo F.O.B 2013 [USD]
E-1	50	2,7	1.018,45	362,5	626,2	1759,33
E-2	300		5.381,62			9296,47
E-3	200		3.825,69			6608,68
E-4	200		3.825,69			6608,68

D.3 COSTOS DE EQUIPOS Y MATERIALES

Etapas	Nomenclatura	Equipo - Material	Descripción del Producto	Código	Fabricante	Cotizado en
Esterilización	-	Microfiltro	OptiCap XL Duapore 2"	KVGLA02H3	Merck Millipore	Merck S.A.
Agua	W-1;W-2	Equipo purificador de agua	LabTower EDI-30	TW-99281-30	Thermo Scientific	Cole-Parmer
	-	Filtro de ventilación	-	TW-99299-45	Thermo Scientific	Cole-Parmer
	-	Filtro de CO ₂	-	TW-99299-03	Thermo Scientific	Cole-Parmer
	-	Filtro de Esterilización	-	TW-99299-25	Thermo Scientific	Cole-Parmer
	-	Cartridge de Desinfección	-	TW-99299-36	Thermo Scientific	Cole-Parmer
Propagación	-	T-Flask 25: 7 [ml]	-	TW-01928-70	Thermo Scientific	Cole-Parmer
	-	T-Flask 25: 10 [ml]	-	TW-01936-02	Corning	Cole-Parmer
	-	T-Flask 150: 175 [ml]	-	TW-01936-22	Corning	Cole-Parmer
	-	Spinner Flask 1 [l]	-	TW-01837-06	Corning	Cole-Parmer
	-	Spinner Flask 3 [l]	-	TW-01837-08	Corning	Cole-Parmer
	-	Spinner Flask 6 [l]	-	TW-01837-12	Corning	Cole-Parmer
	-	Shaker	Rocking Platform Shakers	TW-51401-16	Cole-Parmer	Cole-Parmer
Producción	-	Agitador Magnético	Digital Ceramic Stirrinh Hot Plate	TW-86579-33	Velp	Cole-Parmer
	R-1	Bioreactor	Biostat RM Perfluación 50 L	1311-MAC-5055	Sartorius Stedim	Imp. Dilaco Ltda.
	-	Bolsas Single-Use Bioreactor	Bolsas RM Perfluación 50 L	DBP SOL-SM	Sartorius Stedim	Imp. Dilaco Ltda.
	-	Bolsas Single-Use Medio	-	-	Sartorius Stedim	(a)
	-	Bolsas Single-Use Producto	Flexel 3D Bag for Drum	FXB110960 (b)	Sartorius Stedim	Fisher Scientific
Recuperación y Purificación	E-5;E-6;E-7	SopORTE Estantes Bolsa S-U	Palletank for Mixing	FXC110820 (b)	Sartorius Stedim	Fisher Scientific
	-	Membrana de Ultrafiltración	Cassette Pellicon 2 Biomax-30	P2B030A05	Merck Millipore	Merck S.A.
	UF-1;UF-2	Equipo de Ultrafiltración	Porta Cassette Pellicon	XX42P0060	Merck Millipore	Merck S.A.
	C-1;C-2	Equipo Cromatográfico	AKTApilot system	29-0086-12	GE Healthcare	Fermelo Biotec
	C-1	Columna Cromatográfica HIC	BPG 200/500	18-1103-11	GE Healthcare	Fermelo Biotec
	C-2	Columna Cromatográfica SEC	BPG 140/500	18-1113-08	GE Healthcare	Fermelo Biotec
	-	Medio HIC	Butyl Sepharose 4 FF, 5L	17-0980-04	GE Healthcare	Fermelo Biotec
	-	Medio SEC	Sephacryl S-100 HR 750	17-0612-01	GE Healthcare	Fermelo Biotec
	B-1;B-2; B-3;B-6	Bomba Peristáltica **	1/P 82 Easy Load	TW-77601-10 + TW-07591-20	Masterflex	Cole-Parmer
	B-4;B-5	Bomba Peristáltica **	L/S 17	TW-77800-60 + TW-07554-95	Masterflex	Cole-Parmer
Bombas	B-7;B-8	Bomba Peristáltica	Bomba + Tubos Carga Fácil	XX80EL230	Merck Millipore	Merck S.A.

** Estas bombas fueron cotizadas con cabezal + motor (2 artículos)

(b) Se utilizó el precio de productos de la misma marca, igual capacidad, pero distinto modelo.

*Cole-Parmer: Reichmann y Cia. Ltda.
(a) Se estimó el precio en base a la bolsa para producto.

APÉNDICE E

E.1 PATENTE: MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA

Se presenta a continuación la patente con fecha de solicitud PCT 12 de mayo de 2010, número PCT/KR2010/003021 y fecha de publicación 7 de marzo de 2013, número US 2013/0060013 A1.

En ella se presenta un método de purificación de proteína morfogénica ósea BMP-2, que reduce el número de pasos de purificación y simplifica el proceso respecto al tradicional utilizado; permitiendo una reducción del tiempo y costo. A la vez genera un aumento en el rendimiento final y se obtiene un grado de pureza elevado.



US 20130060012A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
Shim et al.(10) **Pub. No.: US 2013/0060012 A1**(43) **Pub. Date: Mar. 7, 2013**(54) **METHOD FOR PURIFYING BONE
MORPHOGENETIC PROTEIN**(52) **U.S. Cl. 530/399**(75) Inventors: **Young - Bock Shim**, Seoul (KR); **Yeong
- Schick Kim**, Gyeonggi-do (KR); **Yon -
Rak Choi**, Gyeonggi-do (KR); **Ju -
Woong Jang**, Seoul (KR)(57) **ABSTRACT**(73) Assignee: **KOREA BONE BANK CO., LTD.**,
Seoul (KR)

The present invention relates to a method for purifying a protein belonging to the TGF- β , superfamily, preferably BMP, and more preferably BMP-2. According to the invention, the number of purification steps is reduced and the purification process is simplified, compared to the conventional BMP-2 purification method. Thus, the time required for purification can be shortened and the cost can be reduced. In addition, the invention solves the problem that as the time for purification increases and the number of purification steps increases, BMP-2 is degraded by protease or lost during purification steps, resulting in a decrease in the final yield of BMP-2. Thus, the invention increases the final yield of BMP-2. In addition, according to the invention, although the number of purification steps is reduced, BMP-2 having high purity is obtained in high yield by optimizing and using filtrations and chromatographies, and columns, types and concentrations of buffers, and a cut-off size of membrane used in diafiltration, which are different from those of the conventional BMP-2 purification method.

(21) Appl. No.: **13/142,928**(22) PCT Filed: **May 12, 2010**(86) PCT No.: **PCT/KR2010/003021**

§ 371 (c)(1),

(2), (4) Date: **Jun. 30, 2011**(30) **Foreign Application Priority Data**

May 10, 2010 (KR) 10/2010/0043673

Publication Classification(51) **Int. Cl.****C07K 1/36** (2006.01)**C07K 14/71** (2006.01)

Figure 1

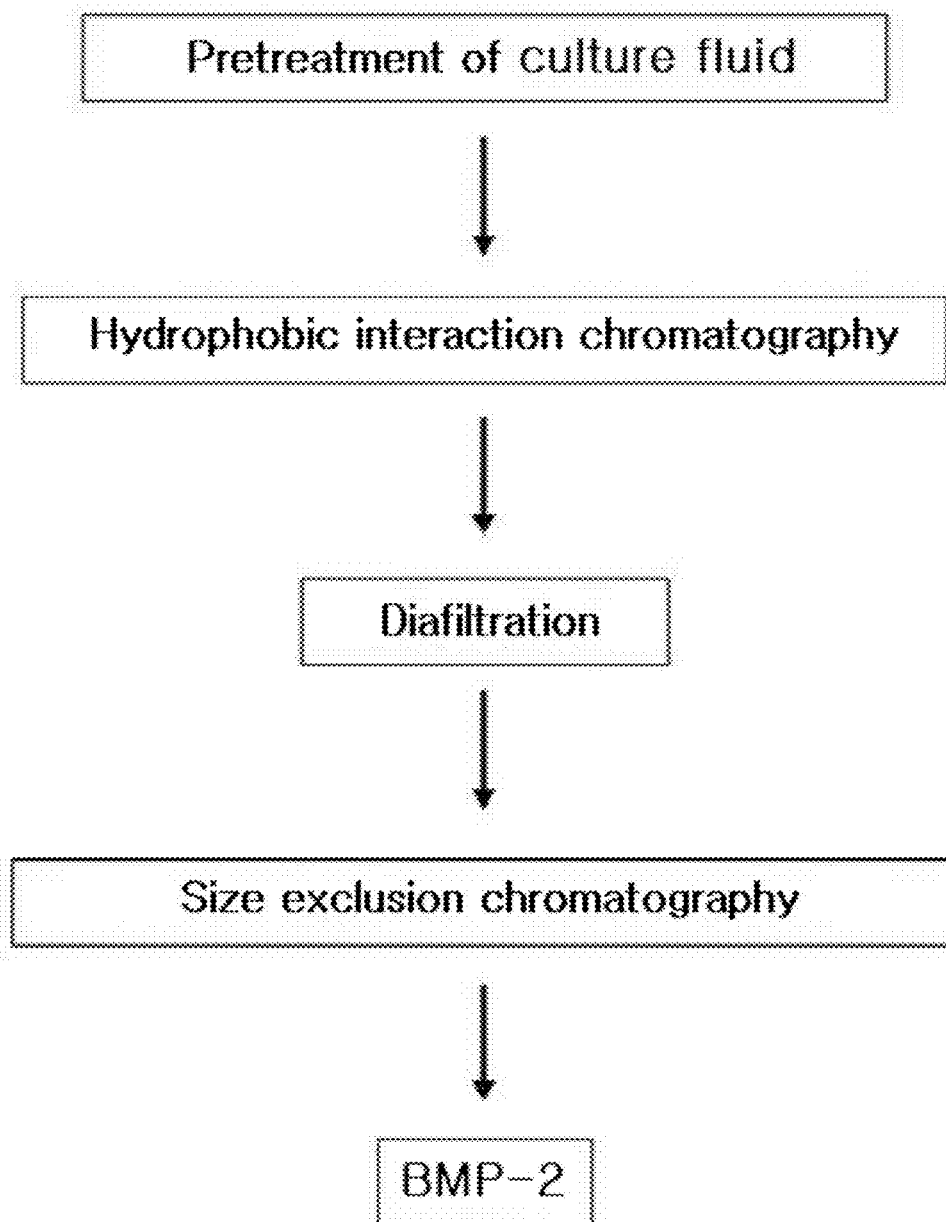


Figure 2

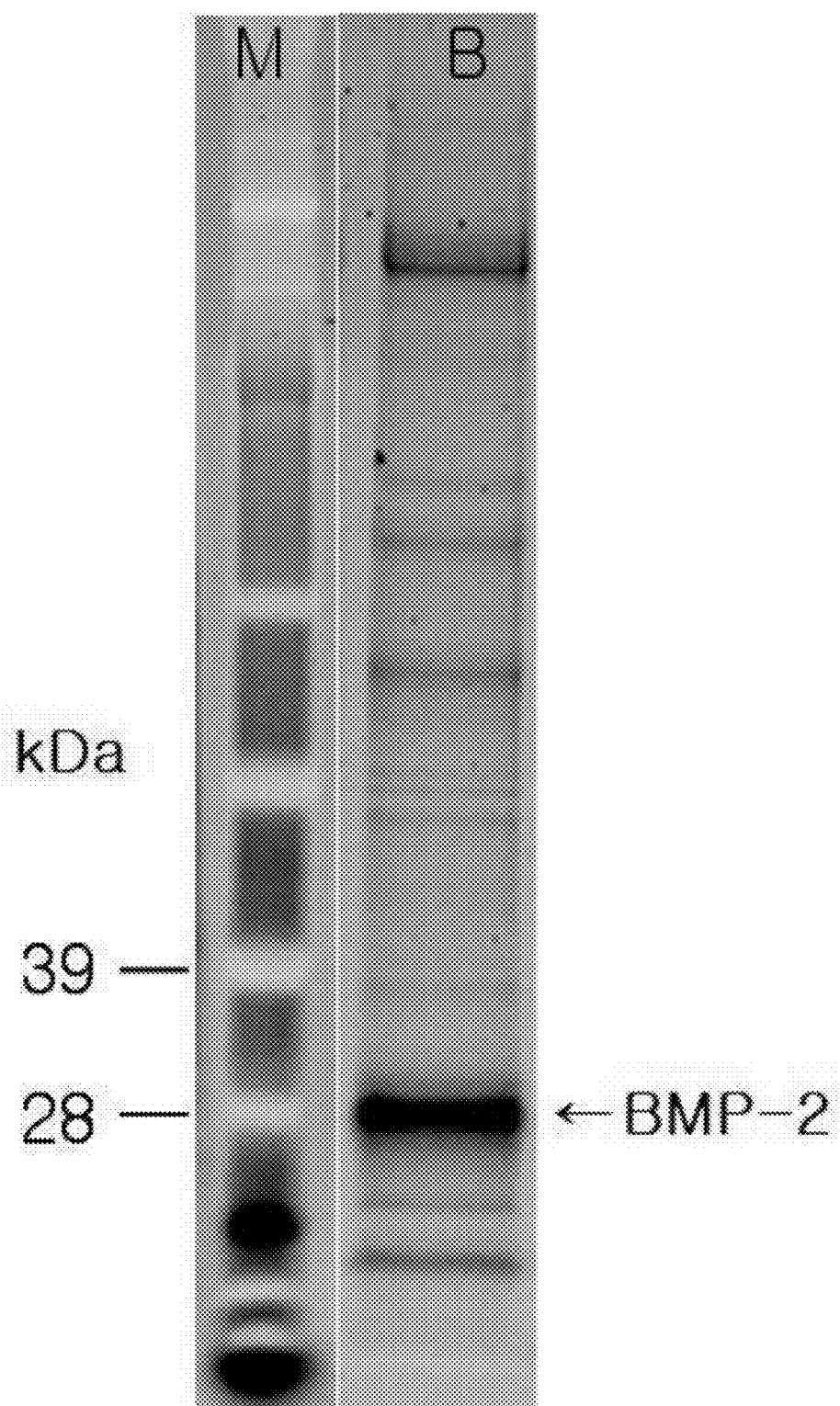


Figure 3

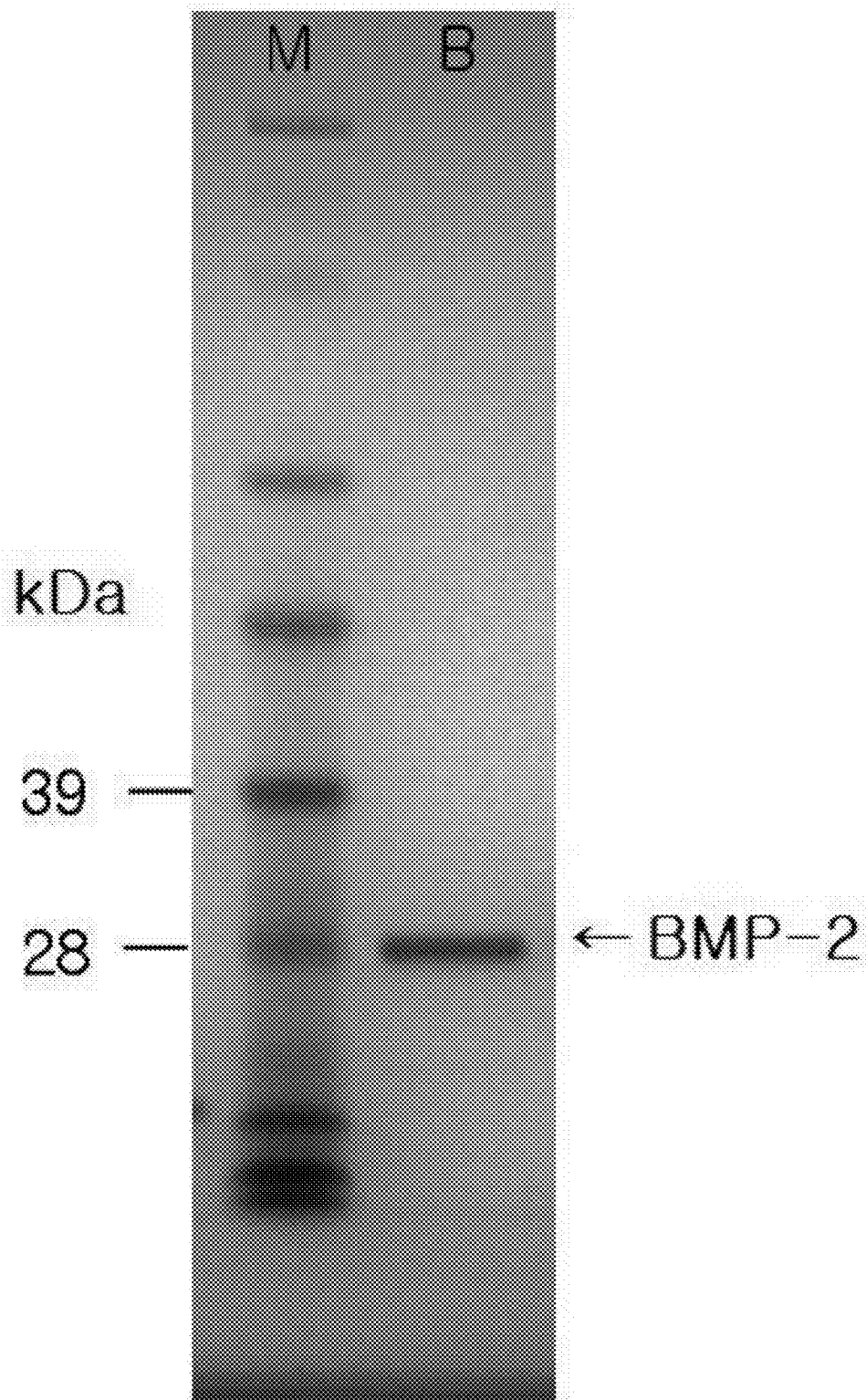
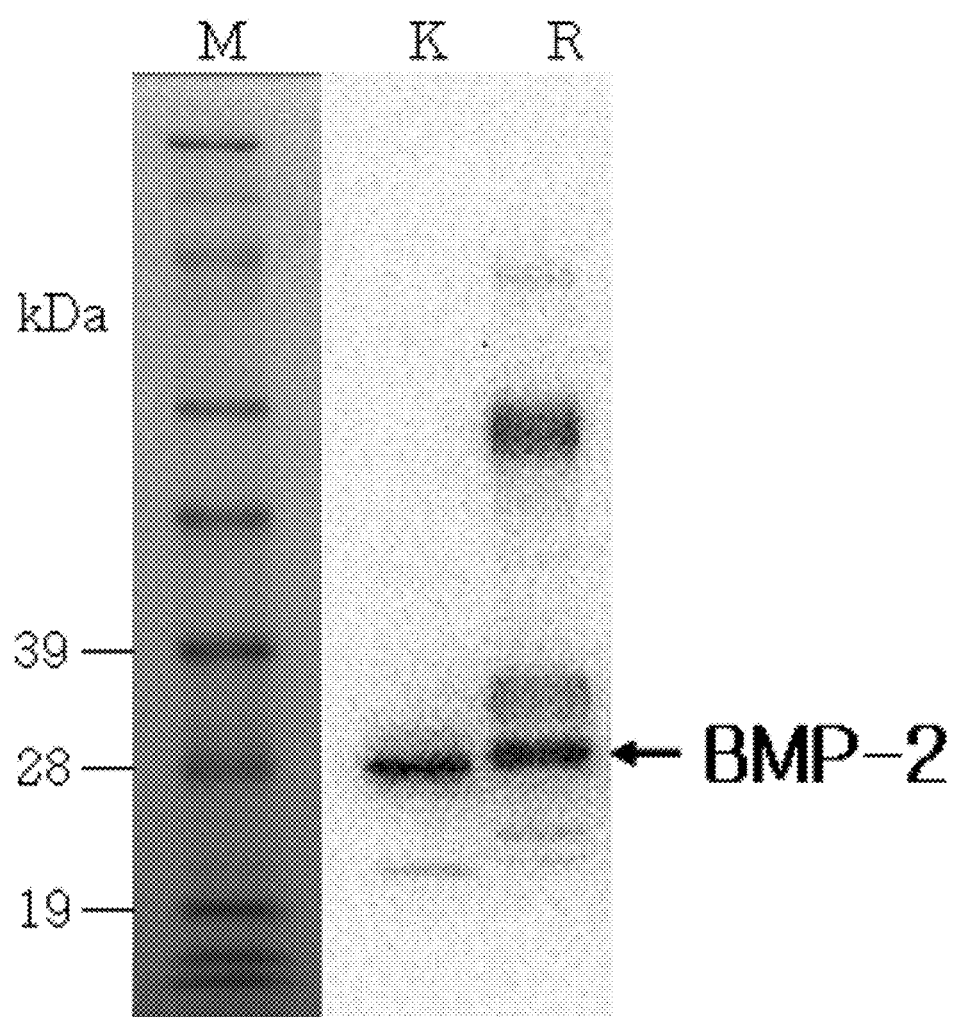


Figure 4



METHOD FOR PURIFYING BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to a method for purifying a protein belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, preferably a bone morphogenetic protein (BMP), and more preferably a bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). Also, the present invention relates to a protein belonging to the TGF- β superfamily, preferably a BMP, and more preferably a BMP-2, purified in high purity and high yield according to said method.

BACKGROUND ART

[0002] Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the TGF- β superfamily of the secreted growth and differentiation factors. The BMP subfamily of the TGF- β superfamily includes at least fifteen proteins, including BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14 and BMP-15.

[0003] It has been reported that BMPs regulate the growth and differentiation of cells such as osteogenic cells, and particularly BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 and BMP-8 are growth and differentiation factors that can induce ectopic bone formation alone in vitro and in vivo. Also, BMP-2 can direct the development of neural crest cells into neural phenotypes, and BMP-4 and BMP-7 can induce a sympathetic adrenergic phenotype. It has been reported that a heterodimer composed of BMP-4 and BMP-7 is a potent inducer of mesoderm (see A. Suzuki, E. Kaneko, J. Maeda and N. Ueno, "Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 232, pp. 153-156, March 1997).

[0004] In addition, BMPs can form either homodimers composed of monomers of a single BMP subfamily member or heterodimers composed of monomers of two different BMP subfamily members linked by a disulfide bond in a head-to-tail arrangement (see K. Azari, B. A. Doll, C. Sfeir, Y. Mu and J. O. Hollinger, "Therapeutic potential of bone morphogenetic proteins," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 10, pp. 1677-1686, September 2001). Also, it was reported that BMP dimers such as BMP-2 homodimers and BMP-2/7 heterodimers are active in vivo (see D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, I. K. Moutsatsos and R. J. Kaufman, "Expression and Characterization of Bone Morphogenetic Protein-2 in Chinese Hamster Ovary Cells," *Growth Factors*, vol. 7, pp. 139-150, 1992; M. F. Mehler, P. C. Mabie, D. M. Zhang and J. A. Kessler, "Bone morphogenetic proteins in the nervous system," *Trends Neurosci.*, vol. 20, pp. 309-317, 1997; T. K. Sampath, J. E. Coughlin and R. M. Whetstone, "Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor- β superfamily," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, pp. 13198-13205, August 1990; D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, R. J. Kaufman, V. Rosen, K. A. Cox and J. M. Wozney, "Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo," *Growth Factors*, vol. 13, pp. 291-300, 1996).

[0005] Particularly, it is known in the art that BMP-2 belonging to the TGF- β superfamily of proteins plays an important role in the development of bone and cartilage, and potentially induce osteoblastic differentiation of a variety of cell types (see "Regulation of human cranial osteoblast phe-

notype by FGF-2, FGFR-2 and BMP2 signaling", Marie P J, Debais F, Hay E, 2002). Also, BMP-2 acts to stimulate bone production, and products that induce new bone formation by implanting BMP-2 into collagen sponges are being marketed.

[0006] In connection with BMP-2 playing an important role in bone tissue regeneration as described above, various studies have been conducted. Accordingly, it is required to remove proteins or impurities other than BMP-2 from cell culture fluids containing BMP-2 and to obtain BMP-2 from the cell culture fluids in high purity and high yield.

[0007] In the prior art, in order to purify BMP-2 from culture fluids of cell, etc. in high purity and obtain it in high yield, several steps of chromatography were combined and performed depending on charges, ligands, the degree of hydrophobicity or size. The type of chromatography used in purification is very diverse, and the purity and yield of BMP-2 greatly vary depending on the type of chromatography. However, as the time for purification of BMP-2 increases and the number of steps for the purification increases, there is a problem in that BMP-2 to be obtained as a final product is degraded by any protease during purification steps or lost during the purification process, resulting in a decrease in the final M yield of BMP-2. Moreover, even if anyone tries to reduce the time and the number of steps for purifying BMP-2 in order to solve this problem, the purity of the finally recovered BMP-2 should not be low.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] In order to solve the problems occurring in the prior art, the present inventors conducted a wide variety of experiments in connection with the chemical and physical characteristics of BMP-2, various types of chromatography, and the resin, column, type and concentration of buffer, washing solution or eluate, and cut-off size of membrane, which are used in each chromatography. As a result, the present inventors have reached the present invention allowing high-purity BMP-2 to be obtained in high yield while reducing the number of purification steps and the purification time.

[0009] The present invention relates to a method for purifying a protein belonging to the TGF- β superfamily, preferably a BMP, and more preferably a BMP-2. Particularly, the method according to the present invention is characterized by comprising the following steps:

[0010] a) pre-treating a solution containing a protein belonging to the TGF- β superfamily, in which the solution is concentrated using a cut-off membrane filter;

[0011] b) subjecting the solution obtained in step a) to hydrophobic interaction chromatography;

[0012] c) diafiltering the solution obtained in step b); and

[0013] d) subjecting the solution obtained in step c) to size exclusion chromatography.

[0014] More preferably, step a) of said method further comprises adding NaCl and Tris to the solution concentrated using the cut-off membrane filter, adjusting the solution to a pH 5-9, and then filtering the solution through a filtration filter.

[0015] More preferably, NaCl and Tris in step a) are added at concentrations of 0.2-5 M and 5-500 mM, respectively.

[0016] More preferably, the cut-off membrane filter used in step a) is a 30 kDa cut-off membrane filter, and the filtration filter has a pore size of 0.1-1.0 μ m.

[0017] More preferably, the hydrophobic interaction chromatography in step b) is butyl sepharose chromatography.

[0018] More preferably, butyl sepharose 4 fast flow resin is used in the butyl sepharose chromatography.

[0019] More preferably, the chromatography in step b) comprises equilibrating a column with a buffer containing Tris and NaCl, loading the column with the solution obtained in step a), washing the column with a buffer containing Tris, NaCl and isopropanol, and then eluting the column with a buffer containing Tris, NaCl and isopropanol.

[0020] More preferably, the column-equilibrating buffer, column-washing buffer and column-eluting buffer in step b) have a pH 5-9, and the concentration of Tris, NaCl and isopropanol is 5-500 mM, 0.2-5 M and 0.1-50 wt %, respectively.

[0021] More preferably, the diafiltration in step c) comprises exchanging and concentrating the solution obtained in step b) with a buffer containing Tris, NaCl, L-arginine and glycerol using a cut-off membrane filter.

[0022] More preferably, the buffer that is exchanged in step c) has a pH 5-9, and contains 5-500 mM of Tris, 0.2-5 M of NaCl, 0.2-5 M of L-arginine and 1-50 wt % of glycerol.

[0023] More preferably, the cut-off membrane filter used in step c) is a 30 kDa cut-off membrane filter.

[0024] More preferably, the size exclusion chromatography in step d) is sephacryl chromatography.

[0025] More preferably, sephacryl S-100 resin is used in the sephacryl chromatography.

[0026] More preferably, the chromatography in step d) comprises equilibrating a column with a buffer containing Tris and NaCl, loading the column with the solution obtained in step c), and eluting the column with a buffer containing Tris and NaCl.

[0027] More preferably, the column-equilibrating buffer and column-eluting buffer in step d) have a pH 5-9, and contain 5-500 mM of Tris and 0.05-5 M of NaCl.

[0028] The present invention also relates to a protein purified according to the above-described method.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[0029] FIG. 1 is a schematic view showing a purification process according to the present invention.

[0030] FIG. 2 shows the result of SDS-PAGE analysis of a BMP-2 eluate recovered from a butyl sepharose chromatography step. In FIG. 2, the band corresponding to "M" indicates a marker for determining the molecular weight of a desired protein, and the band corresponding to "B" indicates a BMP-2 eluate recovered through butyl sepharose chromatography.

[0031] FIG. 3 shows the result of SDS-PAGE analysis of a BMP-2 eluate recovered from a sephacryl chromatography step. In FIG. 3, the band corresponding to "M" indicates a marker for determining the molecular weight of a desired protein, and the band corresponding to "B" indicates a BMP-2 eluate recovered through sephacryl chromatography.

[0032] FIG. 4 shows the result of Western blot analysis of a BMP-2 purified according to the method of the present invention and a BMP-2 purchased from R&D Systems, Inc. In FIG. 4, the band corresponding to "M" indicates a protein marker, the band corresponding to "K" indicates a BMP-2 purified according to the method of the present invention, and the band corresponding to "R" indicates a BMP-2 purchased from R&D Systems, Inc.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0033] In the present invention, a solution containing a protein belonging to the TGF- β superfamily, which is used as a starting material for purification, is preferably a BMP-containing solution, and more preferably a BMP-2-containing solution. Herein, there is no limitation in the type of BMP-2-producing cells, the type of cell culture medium, culture reagents, and culture conditions. For example, Chinese hamster ovary (CHO) cell culture fluids or *E. coli* culture fluids derived from microorganism, which contain BMP-2 together with other proteins or impurities, may be used as a starting material to be purified in the present invention.

[0034] As used herein, the term "Da (Dalton)" used in connection with the cut-off membrane filter is the unit of molecular weight of proteins. For example, if a 30 kDa cut-off membrane filter is used, impurities including proteins having a molecular weight of 30 kDa or less will pass through the membrane filter.

[0035] As used herein, the term "hydrophobic interaction chromatography" refers to a separation/purification method that uses a hydrophobic property of proteins. Many various factors, including the salinity, type and pH of a buffer that is used in hydrophobic interaction, influence the ability to separate proteins. Also, because proteins interact with each other under high ionic strength conditions, the ability to separate the proteins is higher when a starting material is purified in previously partially. In the present invention, butyl sepharose chromatography, phenyl sepharose chromatography, octyl sepharose chromatography or the like may be used for purifying BMP-2 in high purity and high yield. Particularly, a chromatographic method that uses butyl sepharose 4 fast flow resin is preferably used.

[0036] As used herein, the term "size exclusion chromatography" refers to a method for separating materials according to molecular size using uniformly sized, porous, nonionic gels as a stationary phase. Generally, materials that are smaller than the pore size have a long elution time, because they enter the porous stationary phase and have a longer transit time. On the contrary to this, materials that are larger than the pore size have a short elution time, because they cannot enter the porous stationary phase and thus move fast together with the mobile phase. Accordingly, in the size exclusion chromatography, large-sized materials are eluted fast, and small-sized materials are eluted slowly. In the present invention, size exclusion chromatography, for example sephacryl chromatography, superdex chromatography or sephadex chromatography is preferably used for purifying BMP-2 in high purity and high yield. Particularly, a chromatographic method that uses sephacryl s-100 resin is preferably used.

[0037] In chromatography, pH is an important factor determining the stabilization of proteins.

[0038] Pressure and flow rate are important factors that determine the interaction between a desired protein and a column and the ability to separate the desired protein.

[0039] Conductivity indicates the concentration of an electrolyte in a solvent, which influences whether the desired protein is bound to or separated from the column.

[0040] Column volume (CV) indicates the volume of a packed column, and the purification volume is determined according to the CV.

[0041] Equilibration is a process of making a buffer in a column equal to a buffer composition of a sample before being loaded into the column, in order to prevent a protein of interest from being agglomerated or losing its activity by environmental changes. The composition of a buffer that is used for equilibration varies depending on the type of desired protein.

[0042] Loading is a process of injecting a sample into a column. It is general to load about 30-40% of the column volume, but the present inventors made it possible to load about 200% or more of the column volume by controlling the detailed conditions of chromatography.

[0043] Washing is a process of removing impurities other than a desired protein. The concentrations and components of a buffer that is used for washing vary depending on the type of protein to be purified.

[0044] Elution is a process of separating a desired protein from a column. In case that the concentrations and components of a buffer are not suitable, there is a problem in that the purity of the desired protein is reduced, because a large amount of impurities are simultaneously eluted. For this reason, the concentrations and components of a buffer that is used for elution are changed depending on the type of protein to be purified.

[0045] Diafiltration is a combined method of dialysis and ultrafiltration. It is generally used to remove only some solutes from a fluid containing a solvent and two or more solutes having different molecular sizes.

[0046] In diafiltration, feed pump speed indicates the pump speed at which a buffer is flowed into a membrane filter. The feed pump speed is an important factor that determines the yield of BMP-2.

[0047] Feed pressure indicates the pressure of an injection line, which is caused by the feed pump.

[0048] Retentate pressure indicates the pressure of a solvent which is returned without passing through a membrane filter, and it is an important factor determining the yield of BMP-2.

[0049] Permeate pressure indicates the pressure of a solvent which passes through a membrane filter, and it is an important factor determining the yield of BMP-2.

[0050] Accordingly, feed pump speed, feed pressure, retentate pressure and permeate pressure should be comprehensively considered to determine their suitable values in order to purify BMP-2 in high yield and purity.

[0051] As used herein, the term "SDS-PAGE" is an abbreviation for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. It is a technique of separating proteins according to electrophoretic mobility (for example, factors such as the molecular weight or length of a polypeptide chain). In this case, proteins having low molecular weights show long migration distances, and when a Rf value is obtained using a molecular weight marker, the molecular weight of a desired protein can be determined or the desired protein can be identified.

[0052] As used herein, the term "Tris" is an abbreviation for an organic compound known as tris(hydroxymethyl)aminomethane having the formula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$.

EXAMPLES

[0053] Hereinafter, the method of the present invention for purifying BMP-2 among proteins belonging to the TGF- β superfamily will be described in detail with reference to the following examples. It is to be understood, however, that

these examples are for illustrative purposes only and are not to be construed to limit the scope of the present invention. In addition, it is to be understood that those ordinarily skilled in the art may make various modifications to the examples within the scope of the present invention.

[0054] 1. Step of Pre-Treating Culture Fluids

[0055] 30 L of Chinese hamster ovary (CHO) cell culture fluid containing BMP-2 was concentrated to about 3 L using a 30 kDa cut-off membrane filter. Then, NaCl (1 M) and Tris (50 mM) were added to the culture fluid which was then adjusted to a pH of about 7.0. After that, the culture fluid was filtered through a filtration filter having a pore size of 0.2 μm .

[0056] Unlike conventional processes of purifying BMP-2, the BMP-2-containing culture fluid was concentrated about 10-fold before the culture fluid was subjected to chromatography in the present invention, whereby the amount of materials added thereto was reduced to $1/10$. This could shorten the time required for the subsequent hydrophobic interaction chromatography. Also, this could solve the problem that the degree of degradation of BMP-2 increases as the purification time is delayed. Thus, in the present invention, the yield of the finally obtained BMP-2 was increased.

[0057] In conventional processes of purifying BMP-2, it is usual to filter a BMP-2-containing culture fluid directly, but in the filtration step of the present invention, the filtration was performed after adding NaCl and Tris to the BMP-2-containing culture fluid and adjusting the pH of the culture fluid to about 7.0.

[0058] 2. Step of Performing Hydrophobic Interaction Chromatography

[0059] The filtered solution was subjected to a hydrophobic interaction chromatography process using butyl sepharose 4 fast flow resin. In this step, the chromatography column was equilibrated with 3 CV (column volume) of a buffer containing 50 mM Tris and 1 M NaCl (pH: about 7.0). Then, the filtered solution was loaded into the column up to about 2 CV of the packed column volume. Then, the column was washed with 3 CV of a buffer containing 50 mM Tris, 850 mM NaCl and 3-4 wt % isopropanol (pH: about 7.0). After that, the BMP-2-containing solution was eluted with 2 CV of a buffer containing 50 mM Tris, 600 mM NaCl and 10-15 wt % isopropanol (pH: about 7.0).

[0060] Herein, the butyl sepharose chromatography is a process for removing most impurity proteins other than BMP-2 from the culture fluid. The conditions of chromatography vary depending on the type of protein, but in the present invention, the composition and concentration of the buffer used in the butyl sepharose chromatography were optimized, thereby purifying BMP-2 in high yield and high purity.

[0061] The specific conditions in which the butyl sepharose chromatography was performed are shown in Table 1 below.

TABLE 1

Operating parameters of butyl sepharose chromatography		
	Parameter	Desired range
All processes	Pressure	≤ 10 psi
	pH	7.0 ± 0.2
Equilibration	Flow rate	60 cm/h
	Volume	3 CV
	Conductivity	89-90 mS/cm
Loading	Flow rate	30 cm/h
	Volume	2 CV
	Conductivity	80-90 mS/cm

TABLE 1-continued

Operating parameters of butyl sepharose chromatography		
	Parameter	Desired range
Washing	Flow rate	60 cm/h
	Volume	3 CV
	Conductivity	65-66 mS/cm
Elution	Flow rate	30 cm/h
	Volume	2 CV
	Conductivity	45-46 mS/cm

[0062] FIG. 2 shows the result of SDS-PAGE analysis of a BMP-2 eluate recovered from the butyl sepharose chromatography step. In FIG. 2, the band corresponding to “M” indicates a marker for determining the molecular weight of a desired protein, and the band corresponding to “B” indicates a BMP-2 eluate recovered through butyl sepharose chromatography. In the band corresponding to “B”, the portion pointed out by the arrow indicates the BMP-2 to be purified in the present invention.

[0063] The BMP-2 eluate recovered from the butyl sepharose chromatography step was analyzed and, as a result, the yield of BMP-2 was about 95% and the purity of BMP-2 was about 85%.

[0064] 3. Step of Performing Diafiltration

[0065] The BMP-2-containing solution eluted by the hydrophobic interaction chromatography was exchanged and concentrated with a buffer containing 50 mM Tris, 600 mM NaCl, 0.5 M L-arginine and 5 wt % glycerol (pH: about 7.0) using a 30 kDa cut-off membrane filter, thus obtaining about 20 mL of a solution.

[0066] Herein, diafiltration is a preparatory step for size exclusion chromatography after the completion of the hydrophobic interaction chromatography, in which the buffer composition of the sample is optimized to obtain a high-purity BMP-2.

[0067] In the conventional BMP-2 purification process, a 10 kDa cut-off membrane filter was usually used. However, if this 10 kDa cut-off membrane filter is used, there is a problem in that the solution contains impurities such as proteins having a molecular weight of 10 kDa or more in addition to a BMP-2 intended to be purified, and for this reason, additional purification steps and time are further required. On the contrary, the diafiltration step of the present invention uses a 30 kDa cut-off membrane filter to remove impurities, such as proteins having a molecular weight of 30 kDa or less, from the BMP-2-containing solution. Thus, the 30 kDa cut-off membrane filter used in the diafiltration step of the present invention has an advantage in that it can remove a large amount of impurities compared to the 10 kDa cut-off membrane filter.

[0068] Herein, because the BMP-2 protein to be purified in the present invention has a molecular weight of about 28-32 kDa, if the 30 kDa cut-off membrane filter is used, a large amount of BMP-2 can be lost. For this reason, the 10 kDa cut-off membrane filter was used instead of the 30 kDa cut-off membrane filter in the prior art. However, the present inventors controlled parameters, such as the type and concentration of buffer, feed pump speed and feed pressure, to the optimum conditions, whereby the loss of BMP-2 could be prevented while removing impurities having a molecular weight of 30 kDa or less using the 30 kDa cut-off membrane filter. The parameters used in the diafiltration step of the present invention are shown in Table 2 below.

TABLE 2

Operating parameters of diafiltration (30 kDa cut-off)	
Parameter	Desired range
Feed pump speed	20 mL/min
Feed pressure	0.8-1.2 psi
Retentate pressure	0.1-0.2 psi
Permeate pressure	0.1-0.2 psi
TMP (trans-membrane pressure)	0.4-0.6 psi

[0069] 4. Step of Performing Size Exclusion Chromatography

[0070] The concentrated BMP-2-containing solution was subjected to a size exclusion chromatography process using sephacryl s-100 resin. In this step, the chromatography column was equilibrated with 1 CV of a buffer containing 50 mM Tris and 0.6 M NaCl (pH: about 7.0). Then, the concentrated BMP-2-containing solution was loaded into the column up to 4% of the packed column volume. Then, the column was eluted with 1 CV of a buffer containing 50 mM Tris and 0.6 M NaCl (pH: about 7.0).

[0071] The conditions in which size exclusion chromatography is performed vary depending on the type of protein, and the purity of protein purified varies depending on the buffer composition of sample injected into the column and the buffer composition eluted out of the column. Particularly preferred parameters used in the sephacryl chromatography in the present invention are shown in Table 3 below.

TABLE 3

Operating parameters of sephacryl chromatography		
	Parameter	Desired range
All processes	Pressure	≤15 psi
	pH	7.0 ± 0.2
	Flow rate	10-30 cm/h
Equilibration	Volume	1 CV
	Conductivity	65-66 mS/cm
Elution	Volume	1 CV
	Conductivity	65-66 mS/cm

[0072] FIG. 3 shows the result of SDS-PAGE analysis of the BMP-2 eluate recovered from the sephacryl chromatography step. In FIG. 3, the band corresponding to “M” indicates a marker for determining the molecular weight of a desired protein, and the band corresponding to “B” indicates the BMP-2 eluate recovered through sephacryl chromatography. In the band corresponding to “B”, the portion pointed out by the arrow indicates the BMP-2 to be purified in the present invention.

[0073] The BMP-2 eluate purified from the sephacryl chromatography step was analyzed and, as a result, the yield of BMP-2 was about 88% or more and the purity of BMP-2 was about 95%.

[0074] The yield and purity obtained by quantitatively analyzing the BMP-2 determined from each of the BMP-2 purification steps of the present invention are shown in Table 4 below.

TABLE 4

Yield and purity of BMP-2 recovered from each of the purification steps of the present invention		
Purification steps	Yield (%) of BMP-2	Purity (%) of BMP-2
Cell culture fluid	100	5.7
Hydrophobic interaction chromatography	95	85
Diafiltration	95	85
Size exclusion chromatography	88	95
Finally purified BMP-2	88	95

[0075] 5. Experiment for Identification and for Comparison of Purity of BMP-2 Purified According to the Method of the Present Invention

[0076] In order to confirm whether the protein purified according to the method of the present invention is BMP-2 and to compare the purity of the BMP-2 purified according to the present invention with the purity of a BMP-2 purchased from R&D Systems, Inc., Western blot analysis was performed in the following manner.

[0077] (1) 1 μ g of the finally purified rhBMP-2 is mixed with 4 $\times$ SDS-PAGE sample buffer at a ratio of 1:3.

[0078] (2) The mixed sample is boiled at 70° C. for 10 minutes.

[0079] (3) The sample is centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 minutes.

[0080] (4) The centrifuged supernatant is loaded on 4-12% Bis-Tris polyacrylamide gel.

[0081] (5) Then, electrophoresis is performed at a constant voltage of 100 V for 2 hours.

[0082] (6) The electrophoresed protein is transferred onto a PVDF membrane at 100 V for 1 hour.

[0083] (7) The portion of the PVDF membrane, to which the protein, is not attached, is blocked with 5% skim milk-containing TBST for 30 minutes.

[0084] (8) The membrane is allowed to react for 2 hours with TBST containing primary antibody diluted at 3000:1 and 1% skim milk. Herein, the primary antibody is an anti-mouse IgG that binds specifically to BMP-2 and is originated from mouse.

[0085] (9) The membrane is washed 4 times with TBST for 15 minutes each time.

[0086] (10) The membrane is allowed to react for 30 minutes with TBST containing secondary antibody diluted at 5000:1 and 1% skim milk. Herein, the secondary antibody is a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG that binds to the primary antibody and is originated from goat. HRP, i.e. an enzyme catalyzing a reaction with the substrate that causes the color change is attached to said secondary antibody.

[0087] (11) The membrane is washed 4 times with TBST for 15 minutes each time.

[0088] (12) A developing solution is added to the membrane, and then it is analyzed by an image analyzer.

[0089] FIG. 4 shows the result of the Western blot analysis. In FIG. 4, the band corresponding to "M" indicates a protein marker, the band corresponding to "K" indicates a BMP-2 purified according to the present invention, and the band corresponding to "R" indicates a BMP-2 purchased from R&D Systems, Inc. From the results in FIG. 4, it was confirmed that the protein purified according to the present inven-

tion was BMP-2. In addition, the BMP-2 purified according to the present invention had a significantly high purity compared to the BMP-2 of R&D Systems, Inc.

[0090] As described above, according to the method of the invention for purifying a protein belonging to the TGF- β to superfamily, particularly BMP-2, the number of purification steps is reduced and the purification process is simplified, compared to the conventional method for purifying BMP-2. Thus, the time required for purification of BMP-2 can be shortened and the purification cost can be reduced. Also, the present invention solves the problem that as the time for purification of BMP-2 increases and the number of purification steps increases, BMP-2 is degraded by protease or lost during purification steps, resulting in a decrease in the final yield of BMP-2. Thus, the method of the invention increases the final yield of BMP-2.

[0091] In addition, according to the method of the invention, although the number of purification steps is reduced, a high purity of BMP-2 can be finally obtained in high yield by optimizing and using filtrations and chromatographies, and columns, types and concentrations of buffers, and a cut-off size of membrane used in diafiltration, which are different from those of the conventional BMP-2 purification method.

1. A method for purifying a protein belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, comprising the steps of:

- a) pre-treating a solution containing the protein belonging to the TGF- β superfamily, in which the solution is concentrated using a cut-off membrane filter;
- b) subjecting the solution obtained in step a) to hydrophobic interaction chromatography;
- c) diafiltering the solution obtained in step b); and
- d) subjecting the solution obtained in step c) to size exclusion chromatography.

2. The method of claim 1, wherein the protein belonging to the TGF- β superfamily is bone morphogenetic protein (BMP).

3. The method of claim 2, wherein the BMP is bone morphogenetic protein 2 (BMP-2).

4. The method of claim 1, wherein step a) further comprises adding NaCl and Tris to the solution concentrated using the cut-off membrane filter, adjusting the solution to a pH 5-9, and then filtering the solution through a filtration filter.

5. The method of claim 4, wherein NaCl and Tris in step a) are added at concentrations of 0.2-5 M and 5-500 mM, respectively.

6. The method of claim 4, wherein the cut-off membrane filter used in step a) is a 30 kDa cut-off membrane filter, and the filtration filter has a pore size of 0.1-1.0 μ m.

7. The method of claim 1, wherein the hydrophobic interaction chromatography in step b) is butyl sepharose chromatography.

8. The method of claim 7, wherein butyl sepharose 4 fast flow resin is used in the butyl sepharose chromatography.

9. The method of claim 7, wherein the chromatography in step b) comprises equilibrating a column with a buffer containing Tris and NaCl, loading the column with the solution obtained in step a), washing the column with a buffer containing Tris, NaCl and isopropanol, and then eluting the column with a buffer containing Tris, NaCl and isopropanol.

10. The method of claim **9**, wherein the column-equilibrating buffer, column-washing buffer and column-eluting buffer in step b) have a pH 5-9, and the concentration of Tris, NaCl and isopropanol is 5-500 mM, 0.2-5 M and 0.1-50 wt %, respectively.

11. The method of claim **1**, wherein the diafiltration in step c) comprises exchanging and concentrating the solution obtained in step b) with a buffer containing Tris, NaCl, L-arginine and glycerol using a cut-off membrane filter.

12. The method of claim **11**, wherein the buffer that is exchanged in step c) has a pH 5-9, and contain 5-500 mM of Tris, 0.2-5 M of NaCl, 0.2-5 M of L-arginine and 1-50 wt % of glycerol.

13. The method of claim **11**, wherein the cut-off membrane filter used in step c) is a 30 kDa cut-off membrane filter.

14. The method of claim **1**, wherein the size exclusion chromatography in step d) is sephacryl chromatography.

15. The method of claim **14**, wherein sephacryl s-100 resin is used in the sephacryl chromatography.

16. The method of claim **14**, wherein the chromatography in step d) comprises equilibrating a column with a buffer containing Tris and NaCl, loading the column with the solution obtained in step c), and then eluting the column with a buffer containing Tris and NaCl.

17. The method of claim **16**, wherein the column-equilibrating buffer and column-eluting buffer in step d) have a pH 5-9, and contain 5-500 mM of Tris and 0.05-5 M of NaCl.

18. A protein purified according to the method of claim **1**.

* * * * *