

Aplicación del análisis de riesgo en la preparación de soluciones para producción de Quimi-Hib®

Yordanka Ojeda,* Lázaro Heynngnezz, José García, Yagdalena Valdés, Carlos Alberto González, Nuria Rodríguez, Dayana Piñón

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190. La Habana, Cuba. CP 10600.

email: yordanka.ojeda@cigb.edu.cu

Entre las técnicas avanzadas de administración de riesgo se encuentran las herramientas de soporte estadístico, así como los histogramas y gráficos de frecuencia acumulada, los cuales sirven de base para la acumulación de datos. Se realizó un análisis de los mismos y se evaluó la influencia de diferentes parámetros sobre un proceso determinado para la toma de decisiones. Los resultados obtenidos demostraron que existe riesgo de contaminación de las soluciones en una cabina de flujo laminar. Todos los tampones evaluados cumplieron satisfactoriamente con los límites establecidos para el contenido de endotoxinas y límite microbiano. Los valores de carga microbiana, determinados por diferentes métodos en el ambiente de trabajo, estuvieron dentro de los límites, acorde con la clasificación de las áreas. La higienización de los tanques de preparación demostró que los procedimientos empleados garantizaron una adecuada remoción de los contaminantes. Se concluyó que los riesgos y escenarios evaluados fueron aceptables para alcanzar la calidad del producto.

Palabras clave: administración de riesgo, carga microbiana, contaminantes, *Haemophilus influenzae*.

Introducción

En la fabricación de un producto biofarmacéutico en ocasiones no se logra la calidad deseada. Una efectiva administración de riesgo puede asegurar la alta calidad del producto, ofreciendo un medio proactivo para identificar y mitigar el efecto de las fallas potenciales durante las etapas de desarrollo y la fabricación. A pesar de las ventajas que conlleva la administración de riesgo para la industria ha sido poco utilizada en la industria biofarmacéutica, apreciándose un aumento paulatino en los últimos años (1).

Una aplicación de este enfoque lo es la guía "Process Validation Requirements for Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients Subject to Pre-Market Approval" (2). Este documento enfatiza el rol de los principios ingenieros avanzados emergentes y de las tecnologías de control para garantizar la calidad del producto, en aras de que el beneficio de la ciencia se utilice para sustentar la validez de un proceso.

Dos años después de que la FDA introdujera los enfoques basados en el riesgo a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) vigentes, se continúa la búsqueda de vías adicionales para aplicar este enfoque y fomentar la calidad y la innovación en la industria (3). La Conferencia Internacional de Armonización sobre Requerimientos Técnicos de los Medicamentos para uso en humanos (ICH) constituye un proyecto único que agrupa a las autoridades reguladoras y a los expertos de Europa, de los Estados Unidos y de Japón, para discutir los aspectos científicos y técnicos acerca del registro de los productos. En el 2005, el Comité de Dirección de la Conferencia aprobó la guía ICH Q9 (4), con el objetivo

de proporcionar un enfoque sistemático para la administración del riesgo relacionado con la calidad de un medicamento a través de su ciclo de vida. La misma reconoce el empleo limitado de la administración de riesgo de la calidad en la industria farmacéutica. Esto también define la administración del riesgo de la calidad de los medicamentos como un proceso sistemático para el establecimiento, el control, la comunicación y la revisión de los riesgos a través del ciclo de vida del producto.

Ejemplos recientes en la aplicación del análisis de riesgo en la industria biofarmacéutica son: proceso fermentativo para la producción de insulina humana recombinante expresada en *Pichia pastoris* (5); validación del procesamiento aséptico de vacunas (6) y cultivo de tabaco transgénico para producción de anticuerpos monoclonales a utilizar en el proceso productivo del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B con fines vacunales (7).

Las herramientas para la administración de riesgos soportan un enfoque científico para la toma de decisiones, a la vez que proveen métodos documentados, reproducibles y flexibles. Entre ellas se destacan: las herramientas de soporte estadísticos que sirven de soporte a la toma de decisiones (1). Esta herramienta es la utilizada en el presente trabajo, teniendo en cuenta que se necesita una colección histórica de datos de los lotes procesados.

La etapa de conjugación de la producción del ingrediente farmacéutico activo (IFA) de la vacuna sintética conjugada Quimi-Hib® consta de dos reacciones químicas. Las impurezas

* Ingeniera Química.

de cada una de estas reacciones se eliminan mediante la ultrafiltración, a la vez que se modifica su pH utilizando diferentes soluciones. Una de esas soluciones es el disolvente donde se encuentra el producto final. De la obtención de buenos resultados en la preparación de las soluciones dependerá la calidad de este producto.

El objetivo del presente trabajo fue aplicar el análisis de riesgo empleando la metodología de soporte estadístico en la preparación de las soluciones que conforman el IFA de la vacuna sintética conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib).

Materiales y Métodos

Metodología de preparación

El proceso de preparación de soluciones comenzó con la esterilización y despirogenización de los materiales utilizados en esta operación. La adición de los reactivos se realizó en un área grado C y la filtración en una zona grado A, controlando estrictamente el ambiente de trabajo. Las soluciones se prepararon en tanques de 100 L de acero inoxidable (Sartorius, Alemania), previamente higienizados. Luego se filtraron por cápsula Sartobran 0,45+0,2 μm (Sartorius, Alemania), grado esterilizante, y se almacenaron en bolsas de etivinilacetato (EVA) (Stedim, Alemania) a temperatura ambiente (20 ± 4 °C) y humedad relativa $60 \pm 10\%$, que son las condiciones normales del proceso hasta su uso. Las soluciones utilizadas fueron tampón fosfato salino (PBS) pH 8,2; PBS pH 7,4 y tampón fosfato para formulación pH 6,8.

Métodología de muestreo

Para la realización de los muestreos se utilizó el Programa de Monitoreo Ambiental (PMA) que tiene como objetivo fundamental garantizar que las producciones se realicen en ambientes adecuados y que las áreas limpias permanezcan dentro de los parámetros establecidos. Se establecen un conjunto de límites de alerta y acción de forma tal que se pueda evaluar el desempeño del área y tomar acciones correctivas y preventivas.

El muestreo se realizó al flujo laminar de techo (FLT) y al personal donde se realiza la preparación de las soluciones por un período comprendido entre febrero 2010 a octubre 2011.

Técnicas analíticas generales

Chequeo ambiental mediante placa expuesta

El método se basa en la exposición de las placas en determinados puntos del área seleccionados previamente, en dependencia del proceso que se realiza por un período de tiempo de 4 h, para lograr la sedimentación en las mismas de los microorganismos contaminantes ambientales, con la

posterior incubación y conteo de unidades formadoras de colonias presentes en cada placa.

Control microbiológico de superficies por el método de placas de contacto

El método consistió en la determinación del conteo total de viables en superficies lisas con la utilización de placas de contacto, que contiene un medio nutriente agar triptona soya, más un inhibidor de los higienizantes que es lecitina y el polisorbato 80, en caso de realizar el control en superficies que han sido previamente higienizadas.

Muestreo ambiental por el método volumétrico

Se determinó el nivel de contaminación microbiana que existía en las áreas de producción, basándose en el principio de aspiración de un volumen determinado de aire a una velocidad constante sobre una superficie de medio de cultivo.

Determinación del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL)

Se determinó la concentración de endotoxinas bacterianas empleando la técnica del LAL. Este ensayo se basa en la activación de la proenzima del LAL por las endotoxinas de las bacterias gramnegativas. La enzima activada libera la p-nitroanilina (pNA) del sustrato Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, molécula coloreada que es medida fotométricamente a 405 nm y cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de endotoxinas presentes en las muestras. Este método es específico para la determinación cuantitativa de endotoxinas de bacterias gramnegativas.

Determinación del límite microbiano

Se determinó la metodología de control microbiológico de los medicamentos no estériles para el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos, de mohos y levaduras, además del conteo o presencia de bacterias gramnegativas bilis tolerantes y de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, en dependencia del tipo de producto a analizar.

Determinación del carbono orgánico total (COT)

Esta se basó en una estimación indirecta de moléculas orgánicas presentes en las mediciones de carbono en las aguas farmacéuticas. El principio de medición de COT se basa en la oxidación completa de moléculas orgánicas a dióxido de carbono. Los niveles resultantes de CO_2 se correlacionan con la concentración de carbono orgánico. Todas las tecnologías deben discriminar entre el carbono inorgánico (CI) y el CO_2 generado de la oxidación de moléculas orgánicas en la muestra.

Aplicación del análisis de riesgo

Se llevó a cabo la identificación, análisis y evaluación de los escenarios de riesgos mediante técnicas de trabajo en grupo, para lo cual el equipo de expertos se apoyó en las herramientas básicas de trabajo como son: histogramas de frecuencia y tablas de distribución acumulada.

Resultados y Discusión

Un área limpia es un local con unas características ambientales especificadas y controladas en función de las partículas y la contaminación microbiológica. Es construida, mantenida y utilizada de forma tal que se disminuya la introducción, generación y retención de contaminantes (viables y no viables). El programa de monitoreo se diseña y aplica para brindar evidencias de que la calidad del ambiente del área se encuentra dentro de los límites especificados. La aplicación del mismo requiere de un análisis profundo del proceso y las características del producto en cuestión.

Se realizó un análisis de riesgo para evaluar sus escenarios, determinar si son aceptables o no para este tipo de proceso y establecer medidas de mitigación de riesgo en los casos que así lo requieran. El riesgo evaluado en función de la probabilidad de ocurrencia e impacto en el producto final fue la contaminación de las soluciones durante su preparación. En la Tabla 1 se muestran los posibles escenarios de riesgo. Se evaluaron los datos de proceso generados por cada escenario de riesgo en el período 2010-2011, para obtener la mayor cantidad de datos posibles en la realización de este análisis.

Tabla 1. Identificación de los escenarios de riesgos.

Riesgos	Escenario de riesgo
Contaminación de las soluciones en el flujo laminar de techo grado A rodeado de un área grado C	Contaminación del ambiente de trabajo
	Calificación del personal
	Incorrecta preparación de las soluciones
	Mala calidad del agua
	Mala higienización de los tanques de 100 L

Evaluación de los escenarios de riesgo

Contaminación del ambiente de trabajo

Durante la preparación de las soluciones se monitoreó el flujo laminar, además del operario que realiza dicha operación. Todos los resultados dieron dentro de los límites y clasificación del área referidos en el Programa de Monitoreo Ambiental (PMA) (Figs. 1, 2 y 3).

Se observó la tendencia para la medición de partículas viables por el método del analizador volumétrico microbiológico MAS (Fig. 1). El 98,82% (84/85) de los conteos están bajo control y cumplen con el límite de acción (3 UFC/m³) establecido

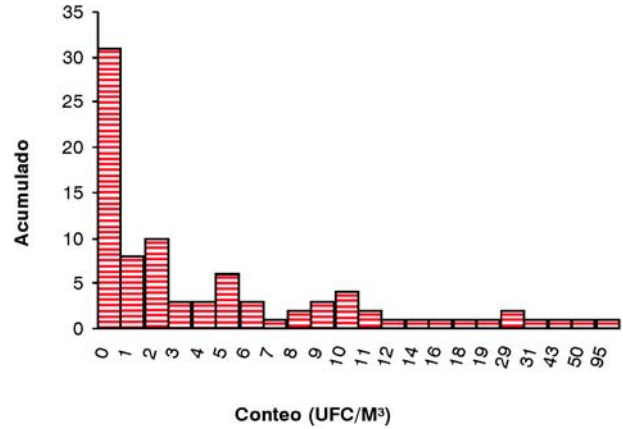


Fig. 1. Tendencia observada para la medición de partículas viables por el método del analizador volumétrico microbiológico (MAS) en el flujo laminar de techo ubicado en el local 221, en el período de febrero 2010-octubre 2011.

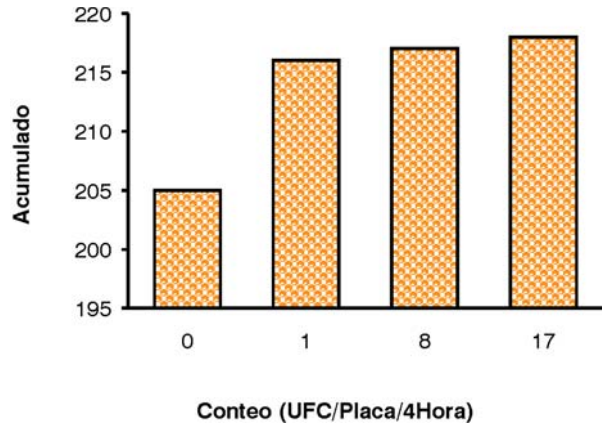


Fig. 2. Tendencia para la medición de partículas viables por el método de placa de exposición (PE) en el flujo laminar de techo ubicado en el local 221, en el período de febrero 2010-octubre 2011.

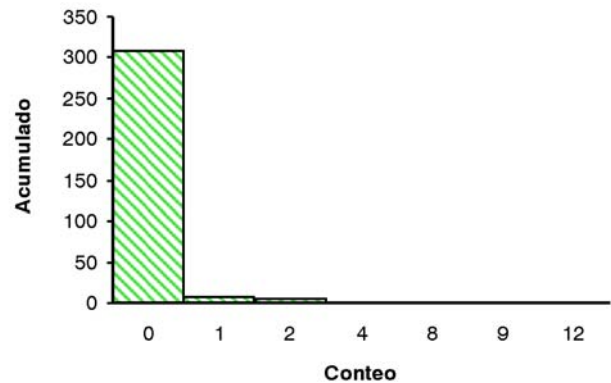


Fig. 3. Tendencia para la medición de partículas viables por el método de PC en el flujo laminar de techo ubicado en el local 221, en el período de febrero de 2010-octubre 2011.

para su clase, según el nivel de limpieza. Solo dos valores incumplieron con el límite de alerta. El comportamiento en general fue similar para los dos años, donde el 97,67% y el 97,62% de los conteos fueron por debajo de 1 UFC/cm² para el año 2010- 2011, respectivamente. El escenario de riesgo fue bajo.

El 99,08% (216/218) de los conteos para la medición de partículas viables por el método de placa de expuesta (PE) estuvieron bajo control y cumplieron con el límite de acción (3 UFC/placa x 4h) establecido para su clase, según el nivel de limpieza. Solo dos valores incumplieron con el límite de alerta (Fig. 2). El desempeño del año 2011, con respecto al 2010, fue del 100% de los conteos por debajo de 1 UFC/placa.

En la medición de partículas viables por el método de PC (Fig. 3), el 98,77% (320/324) de los conteos estuvo bajo control y cumplió con el límite de acción (3 UFC/cm²) establecido para su clase, según el nivel de limpieza. Solo cinco valores incumplieron con el límite de alerta. El desempeño del año 2011, con respecto al 2010, fue del 100% de los conteos por debajo de 1 UFC/cm².

Calificación del personal

El personal que realizó el muestreo de las áreas se encontraba capacitado en las Buenas Prácticas de Fabricación y de vestuario, trabajo bajo flujo laminar y muestreo del PMA (Fig. 4).

En la medición de partículas viables por el método de PC, el 100% (144/144) de los conteos estuvo bajo control y cumplió con el límite de acción (25 UFC /cm²) establecido para su clase (Fig. 4). El desempeño del año 2011 con relación al 2010 fue del 100% de los conteos por debajo de 1 UFC/cm². El escenario se consideró bajo.

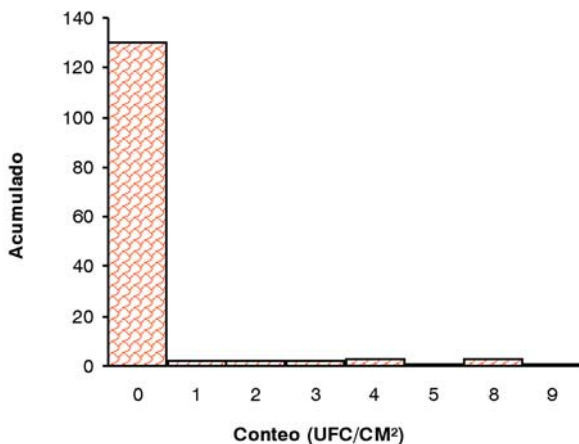


Fig. 4. Tendencia para la medición de partículas viables por el método de PC en la ropa en el local 221, en el período de febrero de 2010-octubre 2011.

Incorrecta preparación de las soluciones

Las soluciones se prepararon con agua para inyección y se filtraron en un sistema cerrado. Se muestran los resultados de límite microbiano para las soluciones antes de ser filtradas (Fig. 5). Este ensayo no tiene límites establecidos. No obstante, según las especificaciones del agua para inyección que se utilizó para prepararlas, se pudo evaluar su comportamiento. Antes de filtrar, de 39 valores de límite microbiano, 30 fueron menores que 1 UFC/mL, para un 77%, y 9 se encontraban entre 12 y 44 UFC/mL, para un 23% del total de los valores. Por lo que el comportamiento del límite microbiano fue normal y después de su filtración siempre fue de 1 UFC/mL, lo demostró que el proceso fue capaz de disminuir la carga microbiana a los valores deseados.

En el caso del LAL se le realizó la determinación de las endotoxinas a los 39 lotes de soluciones que fueron analizados (Fig. 6). El LAL estuvo en un rango controlado para las soluciones, donde el valor debió ser menor que 0,25 UE/ mL que es el límite establecido al agua para inyección; el valor máximo obtenido para las soluciones fue de 0,241 y el mínimo de 0,047. El valor promedio para este ensayo fue de 0,064, resultado que está muy por debajo del límite establecido.

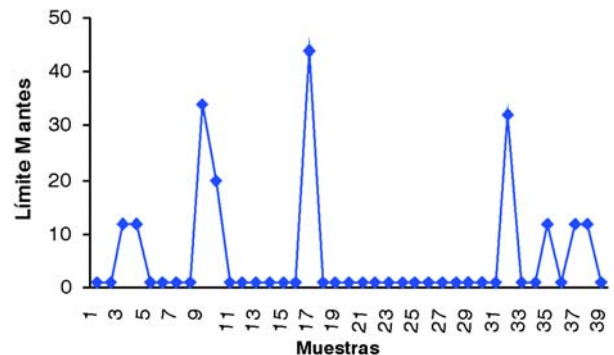


Fig. 5. Resultados de límite microbiano a las soluciones antes de ser filtradas.

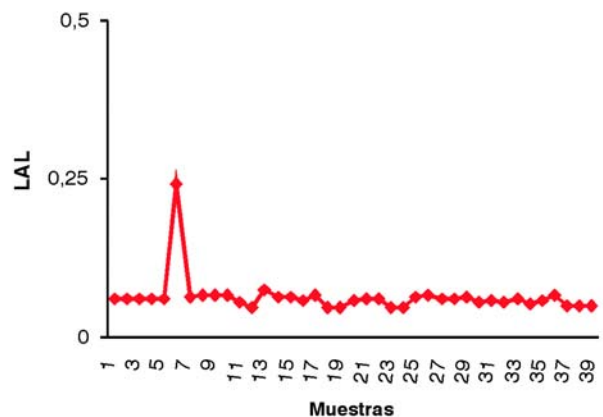


Fig. 6. Resultados de LAL a las soluciones después de ser filtradas.

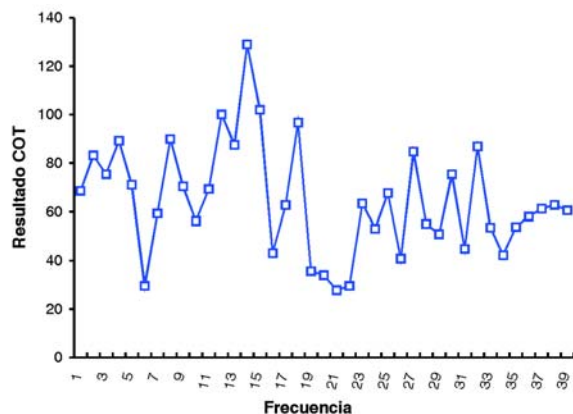


Fig. 7. Resultados de COT de los tanques comparados con los límites de especificación del agua para inyección.

Mala calidad del agua

Tanto en el proceso como en la preparación de las soluciones se utilizó agua para inyección generada en un sistema calificado, cuyos datos históricos de las variables pH, conductividad, microbiología, LAL y COT evidencian un desempeño satisfactorio, acorde con el estándar regulatorio de la industria.

Mala higienización de los tanques de 100 L

Esta metodología se encuentra validada y se realiza por personal calificado que ejecuta la operación de forma rutinaria. Se realizaron alrededor de 39 mediciones de COT al agua del último enjuague. Se muestra un gráfico de dispersión por elementos simples en el tiempo para la variable COT, medida en el agua del último enjuague al finalizar la higienización de los tanques (Fig. 7).

Todos los valores de COT observados en el período se encuentran por debajo del límite de alerta para el agua de inyección, según especificaciones de calidad vigente. El nivel

de limpieza de los tanques agitados usados para la preparación de las soluciones fue aceptable y constituyó un escenario de riesgo bajo. No se requirió aplicar medidas de mitigación de riesgo por este motivo.

Los cinco escenarios de riesgos analizados se consideraron aceptables, por lo que se puede concluir que no influyen en el ambiente de trabajo, donde se preparan las soluciones estériles que son utilizadas en el IFA de la vacuna Quimi-Hib contra *Haemophilus influenzae*. El riesgo contaminación de las soluciones en una cabina grado A rodeado de un área grado C se consideró aceptable.

Referencias

- García I. Diseño e implementación del Sistema de Análisis de Riesgo en el CIGB. [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología; 2011.
- FDA. Process Validation Requirements for Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients Subject to Pre-Market Approval. Silver Spring, US: FDA; 2004.
- Bush L. From cGMPs to the Critical Path. FDA Focuses on Innovation, Quality, and Continuous Improvement - Inside and Out. *Pharmaceutical Technology* 2004;28(7):34-44.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline Quality Risk Management Q9. Federal Register 2006;071:32105-6.
- País Chanfrau JM. Establecimiento del espacio de diseño del proceso fermentativo de obtención de la insulina recombinante en *Pichia pastoris*. [Tesis Doctoral] La Habana, Cuba: Facultad de Ingeniería Química, ISPJAE; 2011.
- Fontanet Tamayo L. Contribución al enfoque de riesgo en la validación del procesamiento aséptico de vacunas mediante la simulación con medio de cultivo. [Tesis Doctoral]. La Habana, Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos, UH; 2008.
- Milá L, Valdés R, Padilla S, Mendoza O, Gómez L, García C, et al. Quality Risk Management Application Review in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Industries. *Bioprocessing Journal* 2010;9(1):26-37.

Risk assessment tools in the preparation of the solutions used in the production of Quimi-Hib®

Abstract

Among the advanced techniques of risk management are the tools of statistical support, such as histograms and cumulative frequency plots, which are the basis for the accumulation of data. An analysis of these and evaluated the influence of different parameters on a particular process for making decisions. The results showed that a risk contamination of the solutions named in a laminar flow cabinet in which filtered. All buffers tested satisfactorily complied with the limits for the content of endotoxin and microbial limit. The microbial load values determined by different methods in the workplace gave values within the limits, according to the classification of areas. The sanitizing preparation tanks showed that the procedures ensured adequate removal of contaminants. It was concluded that the risks and scenarios evaluated to achieve acceptable product quality.

Key words: risk management, microbial load, contaminants, *Haemophilus influenzae*.