

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA  
NACIONAL  
FACULTAD REGIONAL SANTA FE**



**ESPECIALIZACIÓN EN INGENIERÍA  
EN CALIDAD**

**PLAN DE TRABAJO:**

**Elección del producto, peor caso, para realizar la  
validación de limpieza en una industria farmacéutica de  
productos biotecnológicos**

***ALUMNO: Bioquímica. Pelegri Yanina***

***DIRECTOR: Mgtr. Lic. Biotecnólogo Aguirre Juan Francisco***

**AÑO 2024**



## Tabla de contenido

Lista de Abreviaciones:.....	3
1. Introducción .....	4
2. Antecedentes .....	4
2.1. Indicios de contaminación cruzada en líneas de producción multi-producto.....	4
3. Justificación.....	5
4. Hipótesis.....	5
5. Objetivos .....	5
5.1. General .....	5
5.2. Objetivos particulares.....	5
6. Marco Teórico .....	8
6.1. Proteínas recombinantes.....	8
6.2. Validación de limpieza en la Industria Farmacéutica .....	9
6.3. Contaminación Cruzada .....	10
6.3.1. Criterios de aceptación para Productos Biotecnológicos.....	12
6.3.2. Elección del peor Caso: .....	14
6.3.2.1. Limitaciones del enfoque del MACO.....	15
6.3.2.2. Inactivación de las proteínas.....	16
6.3.2.3. Cálculo del índice peor caso .....	16
7. Metodología .....	17
7.1. Evaluación preliminar de los equipos y materiales:.....	17
7.2. Evaluación de Riesgo.....	17
7.2.1. Riesgo a lo largo del proceso:.....	17
7.2.2. Riesgo de contaminaciones cruzadas:.....	18
7.2.3. Complejidad del sistema de limpieza: .....	19
7.2.4. Puntuación General de riesgos:.....	19
7.3. Selección de los agentes de limpieza para la Inactivación de la proteína: .....	20
7.4. Elección del Peor Caso.....	22
7.4.1. Factor de solubilidad $f_s$ .....	22
7.4.2. Dificultad de limpieza $f_D$ .....	22
7.4.3. Factor de ocupación $f_O$ .....	23
7.4.4. Cálculo del WCI .....	24
8. Resultados .....	25



8.1	Identificación de equipos y materiales en contacto con el producto .....	25
8.2	Evaluación de Riesgo, en tres dimensiones (3D): .....	27
8.2.1	Distancia a lo largo del flujo de producción .....	27
8.2.2	Riesgo de contaminaciones cruzadas .....	30
8.2.3	Complejidad del sistema de limpieza.....	31
8.2.4	Riesgo General .....	32
8.3	Inactivación de las Proteínas en Materiales y equipos .....	33
8.3.1	Resumen de Inactivación .....	35
8.4	Producto, Peor Caso .....	36
8.4.1	Solubilidad $f_s$ .....	36
8.4.2	Dificultad de limpieza $f_D$ .....	37
8.4.3	Ocupación en línea $f_o$ .....	38
8.4.4	Cálculo del WCI y elección del Producto .....	38
9.	Discusión y conclusiones .....	40
10.	Bibliografía: .....	42



## Lista de Abreviaciones:

- ACN: Acetonitrilo
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
- BTF: Buenas prácticas de fabricación GMP (Good manufacturing Practices)
- CQ: Calidad Comparativa (Comparative Quality)
- ELISA: (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) enzimoimmunoanálisis de adsorción
- EMA: *European Medicines Agency*
- ENYA: Quimera del TNFII-FC Humano Recombinante, Etanercept.
- FDA: (*Food & Drug Administration*) Administración de Alimentos y Fármacos
- HBEL: Límite de exposición basado en la Salud (*Health based Exposure Limit*),
- HTP (*Human therapeutic protein*) Proteínas terapéuticas humanas
- IFA: Ingrediente farmacéutico Activo
- ISPE: International Society for Pharmaceutical Engineering.
- LOQ: (*Limit of Quantification*) Límite de cuantificación
- MACO/MAC/MSO: *Maximum Allowable Carry Over, Maximum allowable carryover, Maximum Safe Carryover*
- NaOH: hidróxido de sodio
- NOAEL: Nivel de efecto adverso no observado (*No observed adverse effect level*)
- PDA: *Parenteral Drug Association*
- PDE/ADE: Exposición diaria permitida (*Permitted dairy Expose*) o Exposición diaria Aceptable (*Acceptable dairy Expose*)
- PIC/s: Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme
- POE: Procedimiento operativo estandarizado
- PP: Polipropileno
- rhEPO: Eritropoyetina Humana Recombinante
- rhIFN- $\beta$ 1a: Interferon Beta 1 a Humano Recombinante,
- rhFSH: *Follicle Stimulating Humano Recombinant*, Folitropina Humana Recombinante.
- SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
- SL: Límite de Seguridad.
- TACT: Tiempo, Acción, Concentración y Temperatura
- TOC: (Total *organic carbon*) Carbono orgánico Total
- WCB (*Work Cell Bank*) Banco celular de trabajo
- WCI: (*worst case index*) Índice peor caso
- WFI (*Water for injection*) Agua para inyectable



## 1. Introducción

Las compañías farmacéuticas que desean comercializar sus productos deben obtener la habilitación correspondiente por parte de una autoridad sanitaria. En Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) es el organismo regulador encargado de otorgar dicha habilitación.

Según la Disposición 4159/2023, la ANMAT tiene la autoridad para desarrollar, mantener y aplicar las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). En concordancia con esta disposición, la ANMAT establece y hace cumplir las directrices destinadas a garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos, asegurando así que cumplan con los estándares necesarios para su aprobación y comercialización.

Las BPF son estándares regulatorios esenciales diseñados para asegurar que los medicamentos sean producidos bajo condiciones adecuadas que cumplan con los requisitos de calidad establecidos. Estas directrices abarcan diversos aspectos, como la calificación y capacitación del personal, el mantenimiento de instalaciones adecuadas, el uso de equipos adecuados, la selección y control de materiales, así como los métodos y procedimientos de producción. Además, incluyen el control de calidad, el almacenamiento y la distribución de los productos farmacéuticos (ANMAT, 2023).

La validación de limpieza es un componente esencial de las BPF en la industria farmacéutica. Este proceso constituye un requisito fundamental para la habilitación del funcionamiento de una planta elaboradora de productos farmacéuticos, asegurando la integridad y pureza de los medicamentos producidos.

La elaboración de varios productos en una línea de producción presenta un desafío significativo en la industria farmacéutica, ya que aumenta el riesgo de contaminación cruzada entre diferentes productos. Este riesgo se convierte en un aspecto crítico durante el proceso de validación de limpieza, donde es esencial garantizar la eliminación efectiva de residuos y contaminantes para mantener la integridad y calidad de cada producto. En este contexto, las agencias regulatorias esperan que las empresas desarrollen y validen un programa de limpieza acorde a sus necesidades, asegurando que el riesgo de contaminación, el arrastre de producto y la contaminación cruzada estén controlados, minimizados y monitoreados para salvaguardar la seguridad de los pacientes y la calidad del producto (ISPE, 2020).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Indicios de contaminación cruzada en líneas de producción multi-producto.

En 1988, se produjo un evento que incrementó el interés sobre el potencial de contaminación cruzada en la industria farmacéutica; debido a procedimientos inadecuados de limpieza, debiéndose retirar del mercado la resina colestiramina por contaminación con productos intermedios y de degradación de pesticidas. La contaminación se atribuyó a la reutilización de tambores industriales y la empresa no contaba con: Controles adecuados para reutilizar los tambores, proceso de limpieza validados o métodos de prueba para garantizar la eliminación de los residuos.



En 1992, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) emitió una alerta sobre la contaminación cruzada en la fabricación de un granel farmacéutico, donde se utilizaban los mismos equipos para productos esteroides y no esteroides.

La FDA ha mostrado una preocupación especial por la contaminación de productos farmacéuticos no penicilínicos con penicilínicos y de productos esteroideos u hormonales, habiéndose documentado numerosos retiros de productos debido a contaminación cruzada o sospechas de la misma. (FDA,2014)

### 3. Justificación

La limpieza es un elemento de control para disminuir el riesgo de contaminación cruzada. Un proceso de limpieza adecuado debe prevenir que este tipo de contaminaciones ocurran en las superficies compartidas de una línea de producción multi producto. Utilizar un producto representativo, conocido en la industria como el enfoque peor caso, para realizar la validación de limpieza facilita su ejecución, asegurando que la validación de limpieza de este producto valide todos los otros productos al mismo tiempo.

En este contexto, el presente trabajo aplica un análisis de riesgo para determinar cuál de los productos fabricados en la misma línea es el más representativo para realizar la validación de limpieza.

### 4. Hipótesis

La selección de un producto representativo en una línea multiproducto de una industria farmacéutica de productos biotecnológicos permitirá una validación de limpieza eficiente y efectiva, garantizando la minimización del riesgo de contaminación cruzada.

### 5. Objetivos

#### 5.1. General

El objetivo principal del estudio es desarrollar un proceso para evaluar, identificar y priorizar el producto con el mayor potencial de riesgo en una línea de producción de múltiples productos biotecnológicos.

#### 5.2. Objetivos particulares

- Evaluar las regulaciones y normativas vigentes aplicables a la industria farmacéutica para la elección del producto más representativo para realizar la validación de limpieza, especialmente en función a la Industria farmacéutica de productos biotecnológicos.
- Definir el alcance de la validación de limpieza, en cuanto a equipos/materiales involucrados
- Establecer los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) producidos en una misma línea de producción que intervendrán en el estudio.
- Demostrar la inactivación de las proteínas recombinantes durante los procedimientos de limpieza como eje central en la elección del peor caso.



El estudio se realizó en una empresa farmacéutica dedicada a productos biotecnológicos, proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas. Esta se encuentra situada en el Parque Tecnológico Litoral Centro, posee la habilitación para producir:

Eritropoyetina Humana Recombinante (rhEPO). Con un tamaño de lote mínimo de 15 g de rhEPO human en un proceso de fermentación.

Interferón Beta 1a Humano Recombinante (rhIFN $\beta$ 1a). Con un tamaño de lote mínimos de 6 g de rhIFN- $\beta$ 1a en proceso de fermentación.

Quimera del TNFR $\text{II}$ -Fc humano recombinante, Etanercept (ENYA). Con un tamaño de lote mínimo de 550 g de Etanercept en un proceso de fermentación.

Solución concentrada de Folitropina Humana Recombinante (rhFSH) Con un tamaño de lote mínimo de 1,8 g de rhFSH en un proceso de fermentación.

En la Figura 1 se muestra como el sitio se encuentra dividido en dos áreas de producción principales, cada una con su respectiva sala de fermentación y respectivas áreas de purificación, así como salas individuales destinadas a la preparación de soluciones, medios de cultivo y lavado de materiales, para la producción de proteínas recombinantes en células eucariotas.

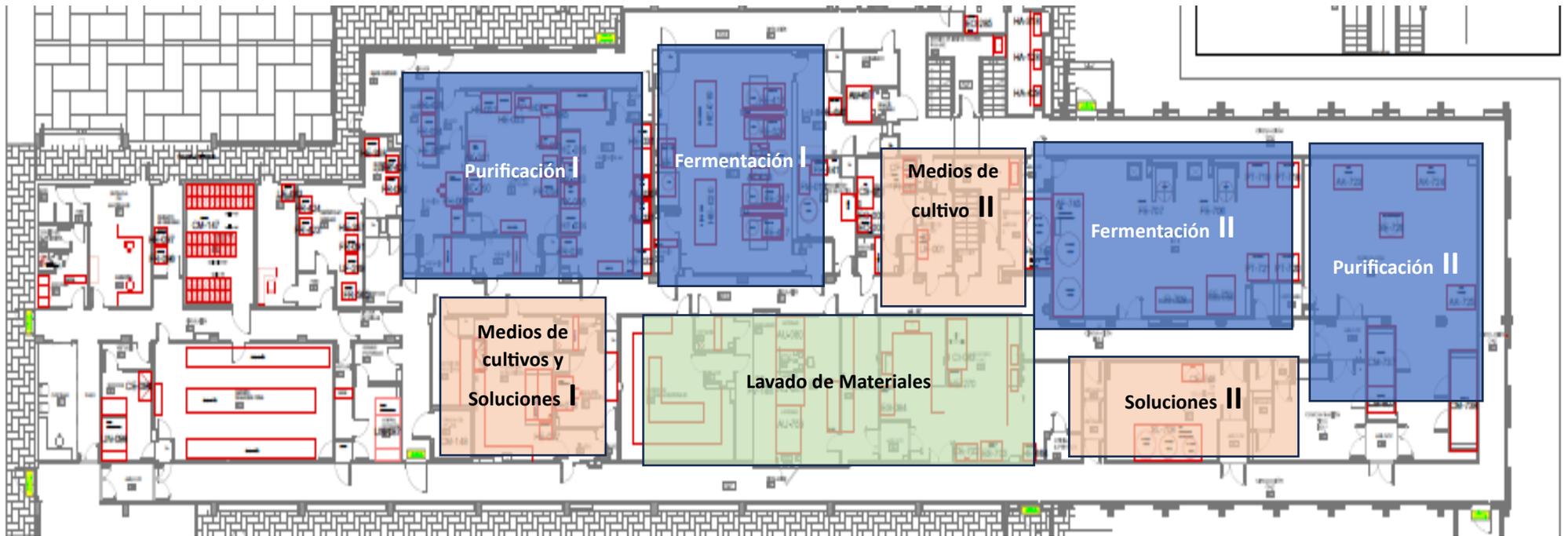


Figura 1: Planos de las Áreas de Manufactura.



## 6. Marco Teórico

### 6.1. Proteínas recombinantes

Los biofármacos, también conocidos como biológicos, son productos medicinales obtenidos o producidos a partir de fuentes biológicas, destinados a fines terapéuticos. Actualmente, se fabrican mediante tecnología de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, una rama de la biología molecular.

En las últimas décadas, el interés en los biofármacos ha experimentado un notable aumento. Este crecimiento se ha visto impulsado por el descubrimiento de *target* terapéuticos específicos, resultado del avance en el conocimiento genético y una comprensión más profunda de los procesos celulares y las enfermedades.

Los primeros productos se obtuvieron a partir de microorganismos recombinantes, principalmente *Escherichia coli*, tales como insulina y la hormona de crecimiento humano. La primera glicoproteína recombinante aprobada para terapia humana fue el activador tisular del plasminógeno obtenido a partir de células del ovario de un hámster chino adulto. Actualmente hay más de 300 productos innovadores aprobados en todo el mundo para uso terapéutico humano, y aproximadamente 2400 productos innovadores y 188 biosimilares en diferentes etapas de desarrollo (Forno y Oggero, 2021).

En la figura 2 se representa como una proteína recombinante se obtiene mediante un proceso que comienza con la introducción de una secuencia de ADN en una célula huésped, utilizando técnicas recombinantes. Esta secuencia de ADN se incorpora al material genético de la célula, que, bajo condiciones controladas como temperatura, concentración de gases y un medio de cultivo específico, da lugar a la producción de la proteína recombinante. Posteriormente, la proteína se cosecha y se somete a procesos de purificación.

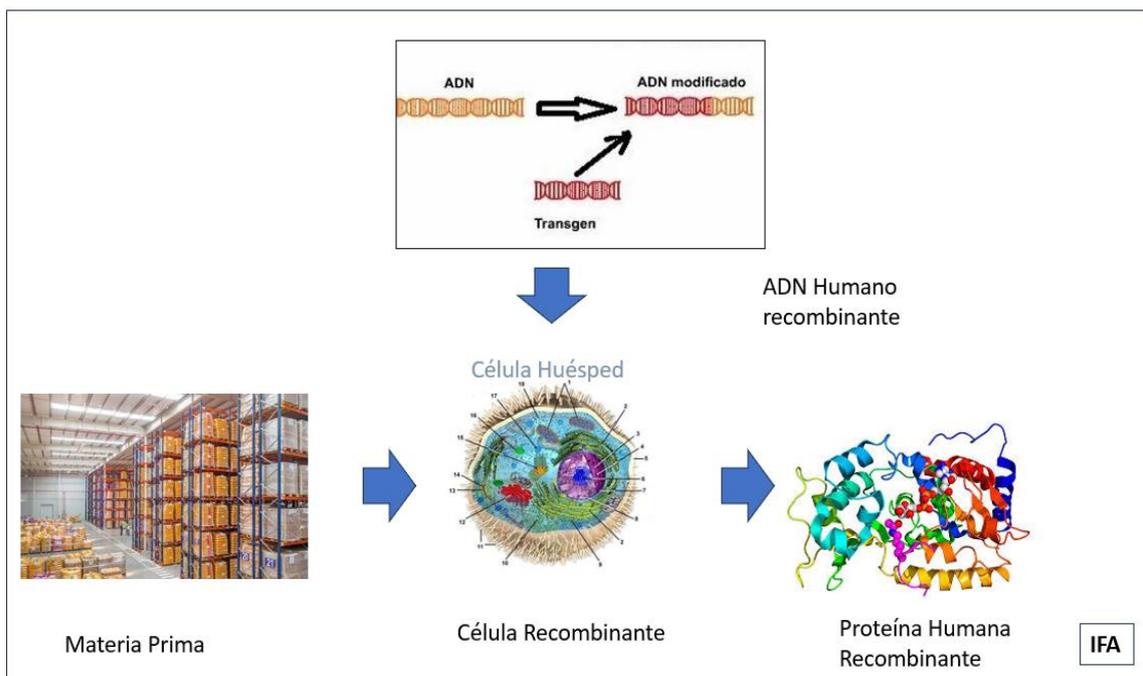


Figura 2: Generación de productos Biofarmacéuticos- Esquema.



En la figura 3 se presenta un proceso biotecnológico, se distinguen dos etapas fundamentales: El proceso que ocurre “aguas arriba” *upstream* y el proceso que ocurre “aguas abajo”. (Forno y Oggero, 2021) Durante la etapa *upstream*, se preparan las células para su crecimiento y producción de una proteína en bruto que será posteriormente recolectada, cosechas. En la etapa *downstream*, se lleva a cabo la purificación de las proteínas cosechadas en el proceso *upstream*, con el fin de obtener un producto final de alta pureza. Este producto final puede ser formulado y utilizado como un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) o como una macromolécula terapéutica. El proceso global se encuentra enmarcado en un sistema de gestión de calidad obligatorio (Normas de Buenas Prácticas de Manufactura, GMP), que incluye el proceso biotecnológico de producción de la proteína humana recombinante o ingrediente farmacéutico activo (IFA) y la etapa galénica de formulación del medicamento. (Forno y Oggero,2021)

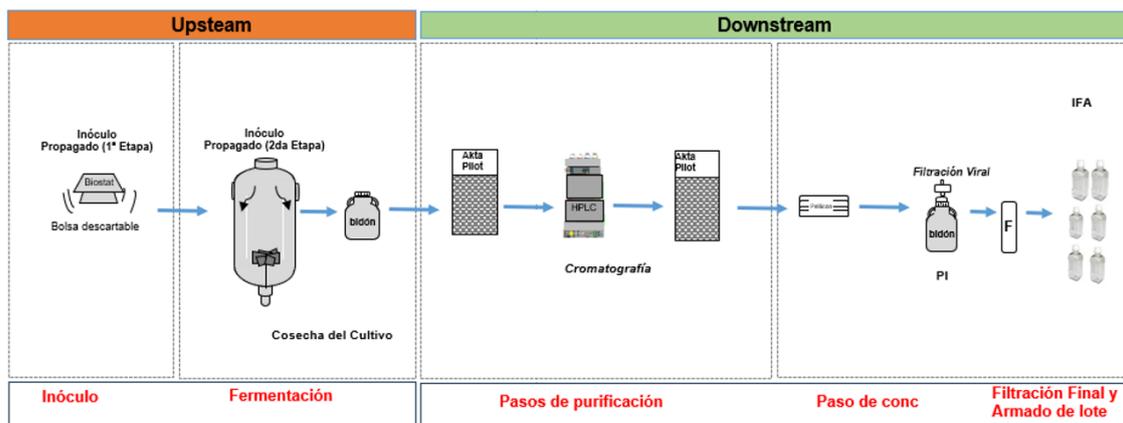


Figura 3: Esquema general de un proceso Biotecnológico

## 6.2. Validación de limpieza en la Industria Farmacéutica

La validación de limpieza debe realizarse con el fin de confirmar la efectividad de cualquier procedimiento de limpieza en todos los equipos que estén en contacto con el producto (PIC/s, 2023)

Es la evidencia documentada de que un procedimiento de limpieza aprobado eliminará de forma reproducible el producto anterior, los agentes de limpieza utilizados en los equipos, por debajo de límite máximo permitido establecido científicamente. Generar evidencia de la efectividad de los procesos se realiza mediante la documentación de los procedimientos, la obtención de datos a través de técnicas analíticas, análisis químicos y microbiológicos que demuestren la eliminación de forma reproducible del producto anterior, contaminantes del proceso o de los agentes de limpieza (ANMAT, 2023).

Las agencias regulatorias y varias industrias han proporcionado documentos de orientación, como guías, estándares y reportes técnicos, que ayudan a alcanzar las expectativas requeridas con el fin de prevenir la contaminación o adulteración de productos, ayudando a establecer criterios de aceptación seguros. Estos documentos de orientación se centran en los requisitos para garantizar el control del proceso de limpieza. Si bien las regulaciones varían entre países, están alineadas en los principios generales



para confirmar que los productos farmacéuticos sean seguros, eficaces y estén libres de adulteraciones por otros componentes o contaminantes (ISPE, 2020).

### 6.3. Contaminación Cruzada

En una línea de producción donde se fabrican múltiples productos, existe la posibilidad de una transferencia no intencionada de materiales o agentes de limpieza de un producto a otro, lo que se conoce como contaminación cruzada (ANMAT,2023). Este fenómeno representa una seria preocupación ya que puede comprometer la calidad, seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos. Por consiguiente, es de vital importancia demostrar la ausencia de contaminación de un producto a otro, así como la efectiva eliminación de los residuos de los agentes de limpieza. Los equipos deben limpiarse de manera que los residuos o arrastres del proceso anterior no comprometan la seguridad, identidad, actividad, pureza ni calidad del producto que se elabora a continuación. De ahí que sea esencial considerar dos aspectos fundamentales al determinar el nivel de limpieza requerido en las superficies en contacto con el producto:

- Deben estar visiblemente limpios
- El nivel de residuo debe ser menor que el límite de seguridad (SL)

Un nivel de residuo seguro (SL) representa el límite de limpieza aceptable, que corresponde a la cantidad segura de residuo en la dosis del siguiente producto o lote. Donde el componente principal es el MACO (Máximo arrastre permitido).

El Límite de seguridad se calcula utilizando la siguiente ecuación (ISPE, 2020):

$$SL = \frac{MACO \times SSA}{TSA \times DV} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

MACO: Máximo arrastre permitido sin comprometer la calidad o la seguridad del producto final (Maximum Allowable Carry Over). Las unidades de esta variable dependerán de como se expresa las unidades del lote mínimo de producción que pueden estar en mg (masa) o mg/ml (concentración)

SSA: el área muestreada para hisopado o el área del equipo cuando se muestrea por enjuague. (cm<sup>2</sup>)

TSA: Superficie Total, es decir el tren de equipos que están con contacto con la proteína. Para equipos compartidos, incluye todos los equipos que comparten actividades. (cm<sup>2</sup>)

DV: volumen de dilución. Es decir, el volumen de elución para hisopados, o volumen de enjuague para los distintos tipos de muestreo (hisopado o enjuague) (ISPE, 2020). Esta unidad se expresa en mililitros (ml)

El cálculo del MACO es usado ampliamente en la industria desde 1999(Walsh y Almann, 2022) para la validación de limpieza. Calculándose con la siguiente ecuación:



$$MACO = \frac{LTD \times MBS}{SF \times MDD} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

LTD: Menor Dosis terapéutica del producto residual. "A" (mg/día)

MBS: Mínimo lote del siguiente producto "B" (mg)

MDD: Máximo dosis diaria del siguiente producto. "B" (mg/día)

SF: Un factor de seguridad (Sin unidades)

El concepto detrás de esto es que una fracción de la dosis terapéutica diaria mínima no tendría efecto terapéutico en un individuo y, por lo tanto, garantizaría la seguridad del paciente (ISPE, 2020). Esta forma de calcular el MACO, con la dosis terapéutica, no está directamente relacionada con la seguridad de la sustancia activa, sino más bien con la eficacia de dicha sustancia. No considera los efectos adversos ni la duración de la exposición (por ejemplo, desde una exposición única hasta una exposición de por vida). Por ese motivo se aplica un gran factor de seguridad (1/1000) para garantizar la seguridad del paciente. Como resultado, los límites basados en la dosis terapéutica suelen ser muy bajos.

Como el MACO es utilizado para calcular el SL es crítico que cada compañía seleccione la fórmula más apropiada para su cálculo, teniendo en cuenta las características o propiedades del componente activo (ISPE,2020).

La fórmula que propone ISPE es la siguiente:

$$MACO = \frac{PDE \times MBS}{MDD} \quad \text{Ecuación 3.}$$

EL cálculo del MACO involucra ahora la exposición del paciente a la sustancia activa a través de un límite de exposición basado en la salud del paciente (*Heald based Exposure Limit*, HBEL). En lugar de utilizar la menor dosis terapéutica (LTD), ahora utiliza el PDE (Exposición diaria permitida) que representa una dosis segura. Esta dosis se considera poco probable que cause efectos adversos si un individuo está expuesto, por cualquier vía, a esta dosis o por debajo de ella todos los días durante toda la vida. (EMA,2014). Este cambio elimina el factor de seguridad (SF), que no estaba directamente relacionado con la seguridad del paciente.

La determinación del PDE implica: I) identificación de riesgos mediante la revisión de todos los datos relevantes, II) identificación de "efectos críticos", III) determinación del nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) de los hallazgos considerados como efectos críticos, y IV) uso de varios factores de ajuste para tener en cuenta diversas incertidumbres (EMA, 2014). El cálculo del PDE requiere la participación de expertos calificados en el área, es decir, Toxicólogos, farmacólogos (ISPE,2020).

Así, el cálculo del MACO ya no depende de la dosis terapéutica y el factor de seguridad, sino que evoluciona hacia un enfoque más centrado en el riesgo al incluir al PDE.



Por lo tanto, las organizaciones deben adoptar este nuevo enfoque, del HBEL para cumplir con las expectativas regulatorias actuales (ISPE,2020).

De todas maneras, hay que recordar que el cálculo del MACO es posible si la sustancia residual es activa luego de realizar la limpieza. La industria farmacéutica de productos biotecnológicos, a diferencia de las industrias farmacéuticas de productos químicos sintéticos, enfrenta un desafío significativo: las macromoléculas terapéuticas y los péptidos pueden desnaturalizarse y degradarse cuando se someten a valores extremos de pH y/o altas temperaturas, lo que puede resultar en su inactividad farmacológica (PDA, 2010). Establecer límites de seguridad para productos desnaturalizado se convierte en una tarea compleja. Esta necesidad impulsó a las guías regulatorias a centrarse en las particularidades de esta industria.

### 6.3.1. Criterios de aceptación para Productos Biotecnológicos.

La complejidad de establecer criterios de aceptación en la industria farmacéutica de productos Biotecnológicos hizo que las distintas agencias regulatorias aborden esta problemática. En el 2010 se emitió un reporte, PDA-49 “Points to consider for Biotechnology Cleaning Validation” proponiendo criterios de aceptación para macromoléculas, que pierden su actividad luego del proceso de limpieza. La guía no recomienda calcular el límite de seguridad (SL) porque involucra el cálculo del MACO, éste enfoque en su momento, proponía límites extremadamente bajos que no podían ser medidos con las técnicas analíticas disponibles para productos degradados, es decir técnicas no específicas.

Debido a las dificultades de medición y los desafíos relacionados con la degradación, se propone un enfoque que se sustenta en la capacidad del proceso. Este enfoque se basa en los logros obtenidos y en el potencial que ofrecen los procedimientos de limpieza utilizados en la fabricación de biotecnológicos, evaluados mediante técnicas no específicas como carbono orgánico total (TOC) (PDA, 2010).

En el 2020 la ISPE en su guía "Cleaning Validation Life-Applications, Methods, and Controls", propone otro enfoque para determinar el SL en una línea de producción multi producto. En la figura 4, se muestra como esta guía diferencia entre productos que conservan su actividad después de la limpieza y aquellos que la pierden. En el caso en que la proteína conserve su actividad después del proceso de limpieza, se adopta un enfoque basado en la actividad del producto y se calcula el MACO mediante el uso del PDE.

Por otro lado, si la proteína pierde su actividad tras la limpieza, se emplea un enfoque comparativo (CQ).



Figura 4: Diferentes enfoques para el cálculo del SL

La nueva opción que propone la ISPE es el enfoque comparativo, este solo puede usarse cuando el producto pierde su actividad luego de la limpieza. Donde las proteínas farmacéuticamente activas son desnaturalizadas a fragmentos inactivos de proteínas terapéuticas humanas (HTP) luego de la limpieza. Estos HTP son impurezas que se transfieren a la dosis del siguiente producto. El límite de seguridad ahora está limitado al PDE de una impureza de referencia. Esta impureza de referencia debe ser peor en comparación a la impureza del proceso en estudio desde un punto de vista de seguridad predictiva y la guía recomienda el uso de la gelatina (Sharnez, 2013) como impureza de referencia, basado en la toxicidad e inmunogenicidad de la Gelatina.

El uso del enfoque comparativo solo es aplicable si existe evidencia documentada de que el producto se inactiva por completo y que los fragmentos resultantes carecen de actividad farmacológica tras el proceso de limpieza. Es decir, si después de exponer las proteínas a los agentes de limpieza, la actividad biológica persiste, entonces se debe recurrir al enfoque del MACO. (ISPE 2020).

En la Figura 5 se muestra el flujograma que explica gráficamente lo antes expuesto. Los estudios de inactivación de la proteína son el centro del proceso, es decir determinar si la proteína se inactiva, indicará el enfoque a tomar. Si la proteína conserva 100% su actividad luego de la limpieza, se calcula el MACO con el PDE del principio activo de cada proteína. Si las proteínas pierden completamente la actividad luego de la limpieza, el enfoque comparativo es el que se utiliza, calculando el MACO con el PDE de la impureza de referencia (Gelatina). Sin embargo, si el producto pierde parcialmente la actividad el límite debe ser determinado por los dos enfoques y usar el límite más estricto (Sharnez et al, 2013)

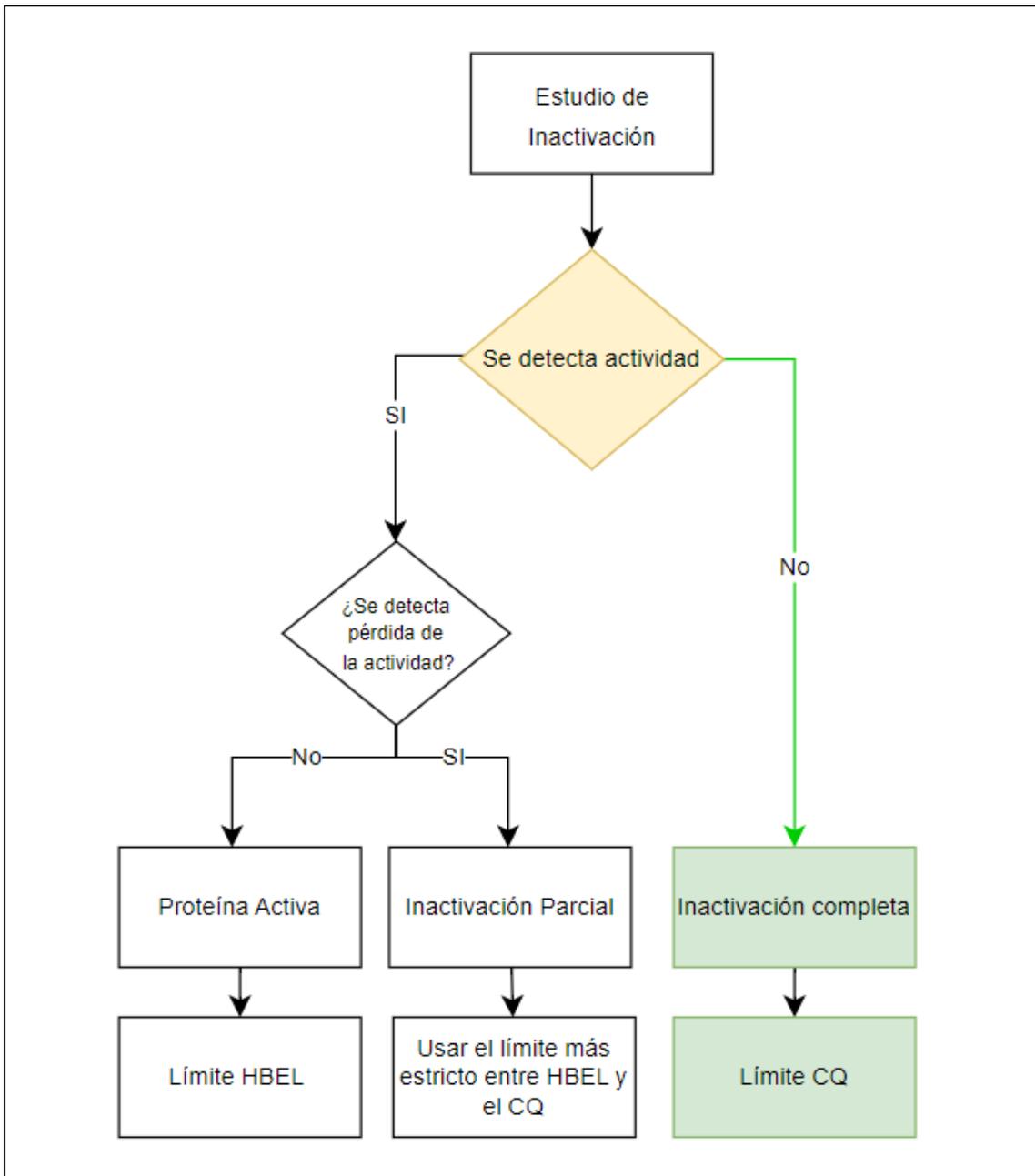


Figura 5: Flujo de Inactivación

### 6.3.2. Elección del peor Caso:

La validación de limpieza en una línea de producción que fabrican múltiples productos puede volverse costosa y lenta si se evalúan todas las combinaciones posibles. Para determinar el número de combinaciones a validar, se puede utilizar la siguiente ecuación, (Porto et al, 2016)

$$\frac{n!}{(n-2)!}$$

Ecuación 4.



Donde:  $n!$  representa el factorial de  $n$  productos, que es el producto de todos los números enteros positivos desde 1 hasta  $n$ . Por otro lado  $(n-2)!$  representa el factorial del número  $n-2$ , es decir, el producto de todos los números enteros positivos desde 1 hasta  $n-2$ . Esta ecuación calcula las combinaciones posibles sin repeticiones. Por lo tanto, si se producen 4 productos como: rhEPO, rhFSH, ENYA y rhIFN $\beta$ , tendría que validar 12 combinaciones.

Para facilitar la validación de limpieza es posible utilizar el enfoque del peor caso como un modelo (ANMAT, 2023), no es necesario validar individualmente cada proceso; en su lugar, se puede aceptar el estudio del peor caso, siempre y cuando se seleccione el producto que represente el de mayor dificultad para limpiar.

La identificación del producto, peor caso, se lleva a cabo mediante una evaluación de riesgos en la que se consideran varios aspectos que representan el peor escenario posible. Una vez elegido el producto, la validación de limpieza se llevará a cabo en los equipos del tren de producción utilizados con el producto seleccionado. Se asume que, una vez aprobada y validada la limpieza del peor caso, los procesos empleados serán válidos tanto para la proteína peor caso como para las otras proteínas producidas. (Porto et al, 2016).

La elección del producto peor casos implica considerar tanto los residuos del producto más difícil de limpiar como aquel que tiene el límite de limpieza (SL) más bajo. Identificar la formulación más difícil de limpiar puede evaluarse de diferentes maneras, a través de las propiedades físicas de las proteínas, incluyendo solubilidad en agua y su composición porcentual para determinar cuál formulación es considerada más difícil de limpiar. Aunque la experiencia del operador para determinar la formulación más difícil de limpiar puede ser subjetiva, suele ser precisa.

Para determinar el peor caso se puede considerar varios factores, como el cálculo del MACO para cada producto, la solubilidad de las proteínas, la facilidad de limpieza en las diferentes superficies (ISPE,2020) y la ocupación en la línea de producción (Porto et al, 2016)

#### 6.3.2.1. Limitaciones del enfoque del MACO

Desde el marco regulatorio se espera que una validación de limpieza de una línea de producción de múltiples productos asegure que el IFA previamente fabricado se transfiera al producto posterior por debajo de los niveles aceptables (SL). Este criterio se evalúa con el MACO, el cálculo del MACO se base en el PDE del IFA previamente fabricado.

Primera limitación, el cálculo del MACO asume que el producto está activo luego de aplicar el proceso de limpieza, esto puede no ser así en productos biotecnológicos.

Otra limitación es que los límites de aceptación muchas veces pueden caer por debajo del Límite de cuantificación (LOQ) de técnicas no específicas tales como el TOC (Carbono orgánico Total). Se han utilizado técnicas de ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) para evitar este problema, pero la pérdida de actividad del IFA hace que los resultados puedan ser confusos.



Dado que los productos biotecnológicos pueden perder su actividad biológica bajo condiciones extremas de pH y/o calor (PIC/s,2023) es factible obviar el cálculo del MACO en la selección del peor caso si se demuestra que los productos o sus fragmentos se inactivan por completo durante el proceso de limpieza. En otras palabras, si se confirma que el producto pierde su actividad farmacológica durante la limpieza, resulta menos relevante verificar la eliminación de un producto activo. En su lugar, resulta más apropiado demostrar la eliminación del producto inactivado (ISPE, 2020).

#### 6.3.2.2. Inactivación de las proteínas

Demostrar la inactivación de las proteínas se realiza mediante el aporte de evidencia documentada que el proceso de limpieza inactiva los productos y que los fragmentos del producto producidos son farmacológicamente inactivos. Las metodologías que se utilizan incluyen simulaciones experimentales de los procesos de limpieza a escala de laboratorio y el uso de métodos analíticos para evaluar inactivación.

Los estudios de inactivación de los productos, como por ejemplo la fragmentación de los mismos, se realizan durante la limpieza, esto puede ser evaluado exponiendo los residuos del producto a las condiciones más desfavorables. Esto implica determinar la concentración y temperatura más baja del agente de limpieza utilizado y el menor tiempo de exposición. Los resultados obtenidos a escala de laboratorio pueden ser extrapolados a los procesos de limpieza en producción porque se utilizaron las condiciones de limpieza más desfavorables debidamente documentadas.

Se recomienda utilizar métodos analíticos como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), Electroforesis capilar o Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Exclusión (SEC HPLC), para evaluar fragmentación.

La actividad del ingrediente activo se realizará mediante técnicas de actividad biológica, que dependerán de cada producto y su actividad específica (ISPE,2020).

#### 6.3.2.3. Cálculo del índice peor caso

Luego de todo lo expuesto anteriormente, si se demuestra inactivación completa de las proteínas involucradas en la línea de producción, el cálculo del MACO como parámetro para el cálculo del peor caso pierde relevancia. (ISPE, 2020).

La elección del producto para realizar la validación de limpieza se realizará utilizando el cálculo del índice peor caso (WCI, *worst case index*). Éste índice considera la solubilidad de los productos, dificultad de limpieza de los diferentes equipos y materiales y la ocupación de los productos en la línea de producción (Porto et al, 2016). En este contexto, el residuo que se busca en la línea de producción no tiene actividad biológica, los mismos son restos proteicos inactivos. Por lo que la actividad de la proteína no es un factor relevante en el cálculo del peor caso.



## 7. Metodología

La empresa XXX S.A., se especializa en la producción de proteínas recombinantes derivadas de cultivos celulares de mamíferos con aplicaciones terapéuticas y son utilizadas como principios activos en la industria farmacéutica.

Para la elección del producto, peor caso, es decir, el producto realizado en una línea de producción que exhibe el mayor grado de complejidad en cuanto a su limpieza, se deberá seguir los siguientes pasos:

### 7.1. Evaluación preliminar de los equipos y materiales:

Se deberán identificar cada uno de los equipos utilizados en la producción de las proteínas para ellos se contará con el apoyo del área de producción. Se agruparán los equipos y materiales con características o propósitos similares en el contexto de la validación de limpieza. Se seleccionarán para este estudio solamente aquellos equipos que estén en contacto directo con las proteínas.

### 7.2. Evaluación de Riesgo

Una vez seleccionados los equipos en estudio se utilizará el modelo de evaluación de riesgo tridimensional (3D) (Oliver,2008). Este es un enfoque que considera tres factores clave para evaluar y gestionar el riesgo en un sistema o proceso determinado. Estos tres factores abordan diferentes aspectos del riesgo y su impacto en la calidad del producto y la seguridad del paciente. Estos factores son:

- Riesgo a lo largo del proceso de producción,
- Riesgo de contaminación cruzada
- Complejidad del sistema de limpieza.

#### 7.2.1. Riesgo a lo largo del proceso:

Se analizará cada etapa de elaboración de las proteínas, sabiendo que a medida que el producto se acerca a final del proceso, el riesgo de detección de defectos aumenta. La puntuación se asignará según la ubicación de los equipos o materiales en el proceso productivo. En la figura 6 se muestra en forma esquemática el proceso para obtener el producto, cada etapa tiene una puntuación de riesgo en función a su ubicación. (Figura 5)

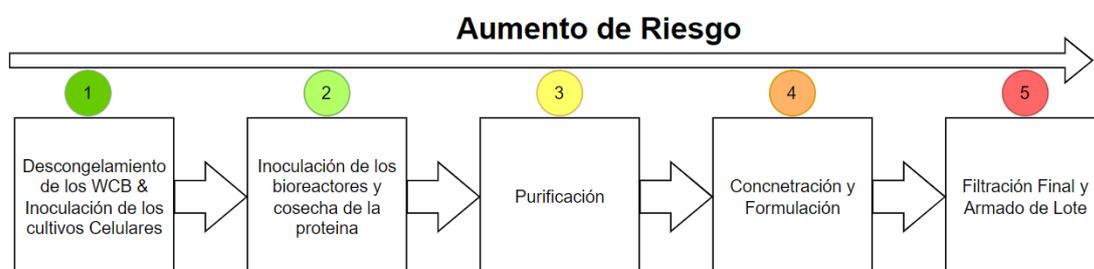


Figura 6 Aumento del riesgo en base a la detección de defectos



Se identifican cinco áreas y cada una de ellas se le asigna una puntuación de riesgo y un valor de riesgo, según su posición en el proceso ver Tabla 1.

Se identificará cada equipo con el área del proceso al que pertenece, asignándole un puntaje de riesgo según el área en la que se utiliza. Por ejemplo, Fermentadores, área de Fermentación, Puntaje de riesgo:2, Valor del Riesgo: bajo/medio.

En el caso de que los equipos o materiales aparezcan en más de un área, se utiliza el puntaje más alto. La Tabla 1 muestra los puntajes asignados en cada área del proceso.

**Tabla 1** Distancia a lo largo del flujo del producto

Área del proceso donde el sistema es usado (1D)	Puntaje de Riesgo	Valor del Riesgo
Descongelamiento WCB y cultivo del inóculo	1	bajo
Cultivo celular, fermentación y cosecha.	2	bajo/medio
Purificación (etapas inicial e intermedia)	3	medio
Formulación y concentración	4	medio/alto
Inactivación Viral/Filtración Viral/Filtración Final y Armado de lote	5	alto

### 7.2.2. Riesgo de contaminaciones cruzadas:

Se evaluará como el sistema interactúa con el producto, se considerará el riesgo de contaminación cruzada en función a los residuos del proceso (residuos proteicos). Por consiguiente, se identificará cada equipo/material y su relación con las proteínas producidas. Se implementará una escala de evaluación basada en el uso del equipo o material en relación con las proteínas producidas. Se asignarán puntuaciones de acuerdo si está en contacto con diferentes proteínas o si es de uso dedicado. La escala propuesta se muestra en la Tabla 2.

Este enfoque permitirá identificar y clasificar los equipos o materiales en función de su potencial para la contaminación cruzada, facilitando la toma de decisiones en la estrategia de validación de limpieza y la implementación de medidas preventivas adecuadas. La puntuación más alta indicará materiales o equipos que están en contacto con todas las proteínas mientras que un valor bajo indicará que el equipo o material es de uso exclusivo. En este trabajo serán excluidos todos los equipos o materiales de uso exclusivo, ya el riesgo de contaminación cruzada es muy bajo.



**Tabla 2:** Distancia del sistema al flujo del producto (impacto en el proceso)

Impacto en el proceso (2D)	Puntaje de Riesgo	Valor del Riesgo
Equipos o materiales dedicados (Una proteína)	1	bajo
Equipos o materiales que se usan con dos proteínas	2	bajo /medio
Equipos o materiales que se usan con tres proteínas	3	mediano
Equipo o Materiales Multi uso	4	alto

### 7.2.3. Complejidad del sistema de limpieza:

La tercera dimensión evaluará la complejidad del sistema de limpieza, se centrará en examinar detalladamente los sistemas de limpieza, los procedimientos, agentes de limpieza utilizados en cada equipo o material. La puntuación se basará si los sistemas de limpieza son manuales o automáticos, además se evaluará otros factores como: la concentración del agente de limpieza, los tiempos de exposición y la temperatura utilizada durante el proceso de limpieza.

Se identificaron cuatro grupos, donde la escala de puntuación propuesta se detalla en la Tabla 3. Esta evaluación permitirá categorizar la complejidad del sistema de limpieza asociado a cada área.

**Tabla 3:** Complejidad del sistema

Complejidad del sistema (3D)	Puntaje de Riesgo	Valor del Riesgo
<b>Material descartable</b> complejidad baja riesgo bajo.	1	bajo
<b>Sistema Automático</b> con hidróxido de sodio y Calor: Este sistema se considera altamente robusto, ya que implica una menor intervención del operador y, por lo tanto, presenta un menor riesgo de falla.	2	bajo/medio
<b>Sistema Semi Automático</b> con uso de solvente: Este sistema también se caracteriza por su robustez, ya que aprovecha las propiedades de las proteínas para limpiar el equipo. Sin embargo, al ser semiautomático, existe una mayor intervención por parte del operario, lo que aumenta ligeramente las posibilidades de error humano.	3	medio
<b>Sistema Manual</b> con Hidróxido de Sodio a Temperatura Ambiente: Este sistema se considera el menos robusto, ya que implica una mayor intervención por parte del operario y, por lo tanto, presenta un mayor riesgo de error humano, lo que aumenta el riesgo asociado.	4	medio/alto

### 7.2.4. Puntuación General de riesgos:

Una vez realizada la evaluación y puntuación en cada dimensión de los equipos y materiales, se obtendrá la puntuación general de riesgo del sistema, (ver ecuación 5)



multiplicando los puntajes de cada una de las dimensiones. Esta multiplicación nos proporciona el puntaje de riesgo general del sistema por equipo o material (Oliver,2008).

$$\text{Riesgo General} = R1^{\circ}D \times R2^{\circ}D \times R3^{\circ}D$$

Ecuación (5)

Este puntaje general nos ayuda a evaluar el riesgo de los equipos y materiales en función a su ubicación en el proceso, su contacto con las proteínas producidas en la línea y la complejidad de los sistemas de limpieza utilizados como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Comparación del nivel de riesgo general

Puntaje de riesgo general	Nivel de riesgo general
1-16	bajo
18-52	medio
53-80	alto

A cada uno de los equipos y materiales se le asignarán un riesgo general. Aquellos equipos o materiales que posean un riesgo general mayor a 18 puntos serán considerados como equipos de riesgo y sus procedimientos de limpieza serán evaluados para determinar si las concentraciones utilizadas pueden inactivar las proteínas o residuos proteicos que entran en contacto con ellos.

### 7.3. Selección de los agentes de limpieza para la Inactivación de la proteína:

Se procederá a evaluar los procedimientos operativos estandarizados (POE) utilizados para limpiar los equipos que obtuvieron un nivel de riesgo general Medio/Alto, es decir valor entre 18 y 80 puntos.

Los típicos pasos en un proceso de limpieza para productos biotecnológicos se muestran en la Tabla 5 (PDA49, 2010):



**Tabla 5:** Pasos para un Procesos de limpieza

Pasos	Función	comentarios
Pre-Enjuague	Remover residuos solubles no adheridos	Reducción de la carga de residuos antes del primer paso de limpieza. Se realiza a temperatura ambiente para evitar desnaturalización de los residuos proteicos
Solución Alcalina de limpieza	Remover los residuos solubles y secos, solubilización de los sólidos por degradación, calor y/o detergentes.	Primer paso para remover los residuos sólidos y microbiológico. Generalmente se realiza a temperaturas altas. Puede incluir detergentes Alcalinos o Hidróxido de Sodio.
Enjuague con Agua	Remoción de los Detergentes Alcalinos y los sólidos suspendidos o solubilizados	Posiblemente no tan intenso como el enjuague final
Enjuague Acido	Neutralización de los residuos alcalinos, lavado adicional de los sólidos solubles en ácido.	Muchas veces no requerido dependiendo de la composición de los residuos
Enjuague final	Remoción de los agentes de limpieza y residuos del producto.	Generalmente realizado a temperaturas elevadas

Los procesos pueden variar de un sitio a otro, uso de detergentes, la presencia de un paso de limpieza con ácido, variación de la concentración del agente de limpieza o el tiempo de exposición.

Aspectos fisicoquímicos de los agentes de limpieza, existen cuatro parámetros de control a evaluar en los procesos de limpieza, estos son: Tiempo, Acción, Concentración y Temperatura, típicamente conocidos como TACT. Estos pueden variar, manteniendo una relación estrecha con el éxito de cada paso de limpieza.

**Tiempo:** Se define como el período del paso de limpieza. Puede medirse directa o indirectamente. Indirectamente, por ejemplo, a través del caudal que define el tiempo.

**Acción:** Es el mecanismo utilizado para administrar el agente de limpieza. Este mecanismo puede caracterizarse por remojo, frotación, flujo turbulento o agitación.

**Concentración:** La concentración de los agentes de limpieza es un parámetro que afecta directamente el éxito del proceso. La elección del agente de limpieza es crucial para su efectividad.

**Temperatura:** Es la temperatura a la que se desarrolla la limpieza, ésta puede variar en los diferentes pasos de limpieza, afectando directamente la eficacia del agente de limpieza.

Se identificarán en los POEs: los parámetros de control TACT. Se seleccionarán las condiciones más rigurosas, es decir, aquellas que presenten la concentración más baja, el tiempo de exposición más corto y la temperatura más baja alcanzada durante los procedimientos de limpieza. El objetivo es demostrar la pérdida de actividad biológica de cada una de las proteínas presentes en los diferentes equipos y materiales.



Las proteínas serán sometidas a las condiciones de limpieza específicas de los equipos en los que se utilizan. Se diseñará una escala de laboratorio que simule las condiciones de limpieza definidas en los procedimientos operativos estándar. Esto permitirá probar la inactivación total de las proteínas y no utilizar el cálculo del MACO, como criterio de elección del producto para realizar la validación de limpieza.

#### 7.4. Elección del Peor Caso

La elección del producto para la validación de limpieza se realizará una vez demostrada la inactivación de todas las proteínas que ocupan la línea de producción.

El producto peor caso, se seleccionará mediante el cálculo del Índice del Peor Caso (WCI, *Worst Case Index*). Este producto elegido representará las condiciones de limpieza más desfavorables y será utilizado para llevar a cabo la Validación de Limpieza. Donde, una vez que este producto sea aprobado y validado, se considerarán validados los otros productos que se realizan en la misma línea de producción, que utilizan los mismos procedimientos de limpieza. De esta manera, el enfoque se centra no solo en validar los procedimientos de limpieza individuales, sino en garantizar la efectividad de todo el proceso de limpieza en general, abarcando todos los productos de la línea de producción. El WCI utiliza para su cálculo la solubilidad del fármaco ( $f_s$ ), la dificultad de la limpieza del equipo ( $f_d$ ) y la ocupación de los productos en la línea de producción ( $f_o$ ). (Porto et al 2016).

##### 7.4.1. Factor de solubilidad $f_s$

La solubilidad se refiere al proceso por el cual estos productos se disuelven en un solvente, en el contexto de la validación de la limpieza, el solvente de elección es el agua. La Tabla 6, detalla las puntuaciones que se le asignará a los diferentes productos en función al factor de solubilidad  $f_s$ . Las proteínas con mayor solubilidad tendrán un factor más alto y uno más bajo si son menos solubles.

Tabla 6:  $f_s$  solubilidad

Solubilidad ( $f_s$ )	Categorías	Descripción
g soluto/ 100 ml agua	3	Muy soluble (99-100% en agua)
	2	Escasamente soluble (entre 10% a 90%)
	1	Casi insoluble (< 0,01% en agua)

##### 7.4.2. Dificultad de limpieza $f_D$

La capacidad de remover el producto es influida por la solubilidad del producto en el solvente de limpieza. Esta evaluación se realiza con el equipo de trabajo, involucrando especialmente a Producción, que es responsable de la ejecución de los procedimientos de limpieza y el conocimiento de la solubilidad de los residuos en los distintos materiales y equipos.



Para determinar el factor de dificultad de limpieza  $f_D$ , se procederá a realizar entrevistas a los operadores del área de producción que tienen la responsabilidad de realizar las limpiezas rutinarias de los equipos y Materiales. Se presentará un cuestionario con tres opciones de respuesta a los operadores. Se establecerá una puntuación basada en la dificultad de limpieza, considerando los productos realizados en la planta. La puntuación propuesta para  $f_D$  se presentada en la Tabla 7. Está relacionada con la dificultad de limpiar los equipos y materiales.

**Tabla 7:** Dificultad de limpieza

Dificultado de limpieza ( $f_D$ )	Categorías	Descripción
Producto más difícil de limpiar (basado en estudio de laboratorio o subjetiva experiencia en planta)	1	Fácil
	2	Medio
	3	Difícil

#### 7.4.3. Factor de ocupación $f_O$

El factor de ocupación está relacionado con el período de uso del área de producción con cada producto. La probabilidad de contaminación cruzada es mayor para los productos que se produce con mayor frecuencia, en comparación con aquellos que se fabrican esporádicamente (Porto et al., 2016).

Es política de la empresa que se fabricará una proteína recombinante en cada una de las alas de la planta, es decir que no se puede producir dos proteínas diferentes en un mismo sector. Cada campaña de producción comienza al descongelarse un banco celular de trabajo (WCB) y termina cuando se realiza la filtración final, armado de lote. Esto puede variar entre proteínas, pero el proceso puede llevar de principio a fin alrededor de 5 meses. Por esta razón el cálculo del  $f_O$  no se realiza contabilizan los lotes producidos por año, sino que se hará realizando un promedio de los lotes producidos desde la última validación de limpieza (últimos 4 años) por cada proteína. Para los productos que se incorporaron luego de la validación, se promediará en función el tiempo que ingreso a la línea de producción. Se proponen 3 categorías en función a los lotes producidos. La Tabla 8, muestra la puntuación propuesta.

**Tabla 8:** Promedio de lotes al año

Factor de ocupación en la línea ( $f_O$ )	Categorías	Promedio lotes/año
factor de ocupación	1	Bajo
	2	Medio
	3	Alto



#### 7.4.4. Cálculo del WCI

Una vez determinados los factores para cada proteína, se calculará el WCI utilizando la siguiente ecuación (Porto et al.,2016):

$$WCI = \frac{f_o \times f_d}{f_s} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde:  $f_s$  es el factor de solubilidad del fármaco en agua,  $f_d$  es un factor que representa la dificultad de limpiar el equipo y  $f_o$  es el factor de ocupación de la línea de producción por un fármaco determinado.

La proteína que reciba el valor más alto de WCI se evaluará como el producto peor caso, y se utilizará para realizar la validación de limpieza.

El diagrama de flujo presentado en la Figura 7 ilustra el proceso y los pasos involucrados para ejemplificar la selección del Peor Caso.

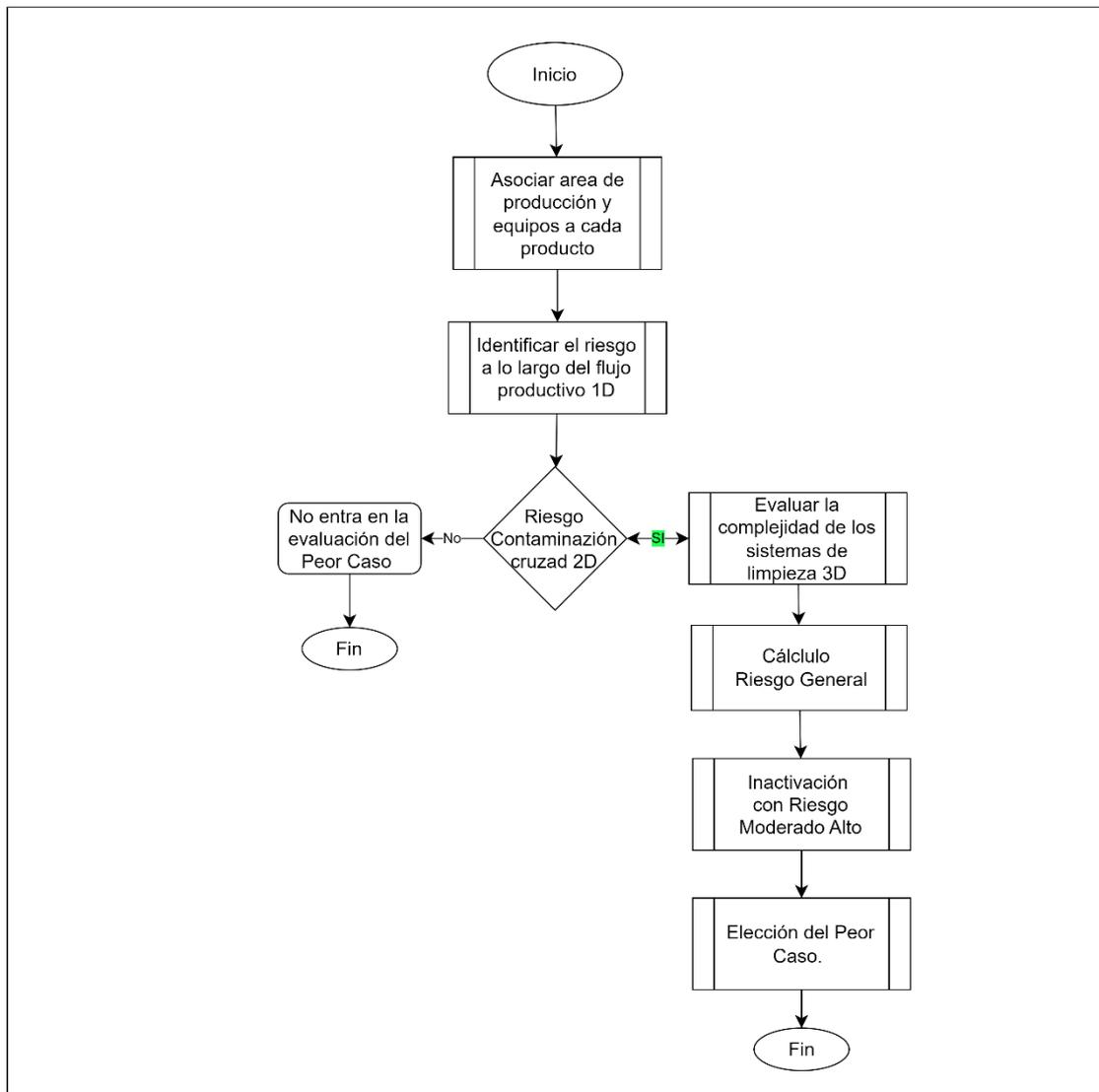


Figura 7: Flujograma para determinar el Peor Caso (WCI)



## 8. Resultados

### 8.1 Identificación de equipos y materiales en contacto con el producto

Se identificaron los equipos que tienen contacto directo con las proteínas producidas en la Planta, y estos se detallan en la **Tabla 9**

Se llevó a cabo una revisión detallada de la lista de equipos gestionada por el área de mantenimiento en colaboración con el área de producción para identificar los equipos involucrados en el proceso. Los equipos/materiales similares se agruparon en familias. En este enfoque, la forma y función definen los criterios para el agrupamiento. Los equipos con diseño y funciones similares, tal vez difiriendo apenas en escala, se agrupan para identificar los agentes y el procedimiento de limpieza involucrado.

Es importante evaluar la función del equipo en el proceso de fabricación. Los equipos grandes que tienen contacto muy íntimo con el producto (Con todo el lote) como cromatógrafos, fermentadores, son prioridad.

Los equipos /materiales menores como frascos, pequeñas piezas, en términos de tamaño y complejidad, se evalúan juntos ya que reciben el mismo proceso de limpieza manual.

En la tabla se identificaron 41 grupos o familias de equipos y materiales. Se identificaron la/s proteína/s que está en contacto con los equipos y materiales como se muestra en la tabla 9.



**Tabla 9:** Identificación de los grupos de equipos/materiales en contacto con las proteínas

N°	Equipos/Materiales	Proteína/s
1	HPLC	rhEPO/ rhIFN-β1a
2	AKTA Pilot	rhEPO / rhFSH / rhIFN-β1a
3	Fermentadores	rhEPO / rhIFN-β1a
4	Bidones Schott (vidrio)	Todas
5	Bidones Polipropileno.	Todas
6	rhEPO HPLC Columna	rhEPO
7	Resina IFN HPLC	rhIFN-β1a
8	Resina (Para ENYA)	ENYA
9	Resina (Para ENYA)	ENYA
10	Resina (Para ENYA)	ENYA
11	Resina (Para rhEPO)	rhEPO
12	Columna 1 rhEPO	rhEPO
13	Resina Q (Para rhEPO)	rhEPO
14	Columna 2 rhEPO	rhEPO
15	Columna 1 rhIFN-β1a	rhIFN-β1a
16	rhIFN-β1a 100 HR 8-12 L	rhIFN-β1a
17	Resina (Para rhEPO)	rhEPO
18	Resina rhIFN-β1a	rhIFN-β1a
19	Columna 2 rhIFN-β1a	rhIFN-β1a
20	Columna 3 rhIFN-β1a	rhIFN-β1a
21	Resina 3 rhFSH	rhFSH
22	1.Columna rhFSH	rhFSH
23	2.Columna rhFSH	rhFSH
24	Filtración Tangencial	Todas
25	Trent de filtros	Todas
26	Fermentadores rhFSH	rhFSH
27	Fermentadores de 500lts	ENYA
28	AKTA ENYA	ENYA
29	rhEPO HPLC Columna	ENYA
30	Resina rhIFN-β1a HPLC	rhFSH
31	Columna rhFSH	rhFSH
32	Columna rhEPO	rhEPO
33	Columna rhFSH	rhFSH
34	Columna rhFSH	rhFSH
35	Columna rhFSH	rhFSH
36	Columna rhIFN-β1a	rhIFN-β1a
37	Fermentador del Inóculo	Todas
38	Fermentador de 50 litros	rhEPO /IFN
39	Fermentadores Inoculo	ENYA
40	ATF	ENYA
41	Bidones PP	ENYA

Una vez identificado los equipos involucrados en el estudio se procede a evaluar los equipos mediante un análisis de riesgo en tres dimensiones.



## 8.2 Evaluación de Riesgo, en tres dimensiones (3D):

### 8.2.1 Distancia a lo largo del flujo de producción

En la primera dimensión, se clasificaron los equipos según su ubicación dentro del proceso. Se estableció la jerarquía de riesgo en la línea de producción, (Figura 6), se asignó la puntuación de 1 a 5, siendo 1 para aquellos equipos menos riesgoso porque se encuentra al inicio del proceso. En las primeras etapas del proceso de fabricación, se establecen sistemas de control de calidad que pueden detectar posibles defectos en el sistema por eso el riesgo es menor. Mientras que aquellos equipos o materiales están al final del proceso, tienen una probabilidad de detección menor, son más riesgosos porque están más cerca del punto de entrega al paciente, es decir al final de proceso. Por lo tanto, el riesgo para la calidad del producto aumenta en las etapas finales del proceso según el nivel de detección de defectos. La Figura 8 muestra un esquema general de producción con la ubicación de los equipos y los diferentes procesos de limpieza involucrados. El primer Nivel, comienza con el descongelamiento del crio tubo y preparación de las células para comenzar su reproducción, inoculando el fermentador. Una vez alcanzada la madures y cantidad celular se traspara el inocular a los tanques de fermentación donde se llevará a cabo la cosecha de las proteínas Nivel 2. Las proteínas obtenidas en los fermentadores se purifican en los diferentes cromatógrafos, Nivel 3. El nivel 4 es el último paso de purificación y el Nivel 5 es la filtración final y armado del lote.



Elección del producto, peor caso, para realizar la validación de limpieza en una industria farmacéutica de productos biotecnológicos

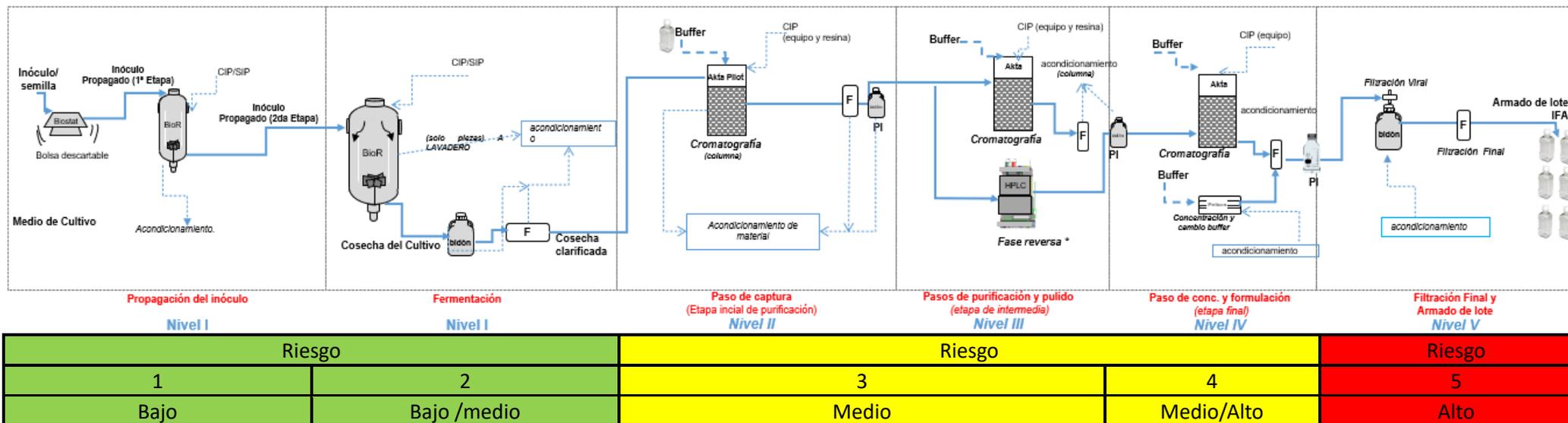


Figura 8 Esquema de Producción General



Los equipos identificados en la tabla 8 fueron evaluados, y se le asignó un puntaje de riesgo en función de su ubicación en el proceso como muestra la Tabla 10.

**Tabla 10:** Riesgo en función de su ubicación en el proceso.

Nº	Equipo	Puntaje de Riesgo 1D	Valor de riesgo (1D)
1	HPLC	3	Medio
2	AKTA Pilot	4	Medio/Alto
3	Fermentadores	2	Bajo/Medio
4	Bidones Schott (vidrio)	4	Medio/Alto
5	Bidones PP	5	Alto
6	rhEPO HPLC Columna	3	Medio
7	Resina rhIFN- $\beta$ 1a HPLC	3	Medio
8	Resina (Para ENYA)	3	Medio
9	Resina (Para ENYA)	3	Medio
10	Resina (Para ENYA)	3	Medio
11	Resina (Para rhEPO)	3	Medio
12	Columna 1 rhEPO	3	Medio
13	Resina Q (Para rhEPO)	3	Medio
14	Columna 2 rhEPO	3	Medio
15	Columna 1 rhIFN- $\beta$ 1a	3	Medio
16	rhIFN- $\beta$ 1a 100 HR 8-12 L	3	Medio
17	Resina (Para rhEPO)	3	Medio
18	Resina rhIFN- $\beta$ 1a	3	Medio
19	Columna 2 rhIFN- $\beta$ 1a	3	Medio
20	Columna 3 rhIFN- $\beta$ 1a	3	Medio
21	Resina 3 rhFSH	3	Medio
22	1.Columna rhFSH	3	Medio
23	2.Columna rhFSH	3	Medio
24	Filtración Tangencial	4	Medio/Alto
25	Trent de filtros	5	Alto
26	Fermentadores rhFSH	2	Bajo/Medio
27	Fermentadores de 500lts	2	Bajo/Medio
28	AKTA ENYA	3	Medio
29	Columnas ENYA	3	Medio
30	Resina IFN HPLC	3	Medio
31	Columna rhFSH	3	Medio
32	Columna rhEPO	3	Medio
33	Columna rhFSH	3	Medio
34	Columna rhFSH	3	Medio
35	Columna rhFSH	3	Medio
36	Columna rhIFN- $\beta$ 1a	3	Medio
37	Fermentador del Inóculo	1	Bajo
38	Fermentador de 50 litros	1	Bajo
39	Fermentadores Inoculo	1	Bajo
40	ATF	2	Bajo/Medio
41	Bidones PP	5	Alto



## 8.2.2 Riesgo de contaminaciones cruzadas

En este paso, segunda dimensión, se identifica el riesgo de contaminación cruzada de los equipos o materiales que están en contacto con diferentes productos. Para ello, se evaluó según su uso en los procesos de elaboración de las proteínas, es decir, si son dedicados a un proceso específico o tienen uso múltiple (Ver indicaciones de la tabla 2). Esta distinción resulta fundamental para una evaluación más precisa de los riesgos asociados a las contaminaciones cruzadas en cada tipo de equipo/material durante los procesos. Donde aquellos equipos/materiales, que solo se usan con una proteína, es decir de uso exclusivo, serán puntuado con un Riesgo: 1, un riesgo bajo. Aquellos que se usan con dos proteínas, Riesgo: 2 Medio bajo, con tres proteínas Medio alto Riesgo:3 y con todas las proteínas 4, Riesgo 4. La Tabla 11 muestra el puntaje de riesgo asignado a los equipo o material del paso anterior.

**Tabla 11:** Impacto en el Proceso, riesgo de contaminación cruzada

N°	Equipo	Puntaje de Riesgo(2D)	Valor de Riesgo
1	HPLC	2	Bajo/Medio
2	AKTA Pilot	3	Medio
3	Fermentadores 100	2	Bajo/Medio
4	Bidones Schott (vidrio)	4	Alto
5	Bidones PP	4	Alto
6	rhEPO HPLC Columna	1	Bajo
7	Resina rhIFN-β1a HPLC	1	Bajo
8	Resina (Para ENYA)	1	Bajo
9	Resina (Para ENYA)	1	Bajo
10	Resina (Para ENYA)	1	Bajo
11	Resina (Para rhEPO)	1	Bajo
12	Columna 1 rhEPO	1	Bajo
13	Resina Q (Para rhEPO)	1	Bajo
14	Columna 2 rhEPO	1	Bajo
15	Columna 1 rhIFN-β1a	1	Bajo
16	rhIFN-β1a 100 HR 8-12 L	1	Bajo
17	Resina (Para rhEPO)	1	Bajo
18	Resina rhIFN-β1a	1	Bajo
19	Columna 2 rhIFN-β1a	1	Bajo
20	Columna 3 rhIFN-β1a	1	Bajo
21	Resina 3 rhFSH	1	Bajo
22	1.Columna rhFSH	1	Bajo
23	2.Columna rhFSH	1	Bajo
24	Filtración Tangencial	1	Bajo
25	Trent de filtros	1	Bajo
26	Fermentadores rhFSH	1	Bajo
27	Fermentadores de 500lts	1	Bajo
28	AKTA ENYA	1	Bajo
29	Columnas ENYA	1	Bajo
30	Resina rhIFN-β1a HPLC	1	Bajo
31	Columna rhFSH	1	Bajo
32	Columna rhEPO	1	Bajo
33	Columna rhFSH	1	Bajo
34	Columna rhFSH	1	Bajo
35	Columna rhFSH	1	Bajo
36	Columna rhIFN-β1a	1	Bajo
37	Fermentador del Inóculo	3	Alto



38	Fermentador de 50 litros	2	Bajo/Medio
39	Fermentadores Inoculo	1	Bajo
40	ATF	1	Bajo
41	Bidones PP	1	Bajo

Una vez evaluados los equipos y materiales, se excluyen aquellos que son de uso exclusivo, es decir, aquellos con un valor de riesgo igual a 1, por representa un riesgo bajo de contaminación cruzada. La identificación del Producto Peor Caso está vinculada a la prevención de contaminaciones cruzadas entre proteínas. Esta exclusión reduce en un 83% los equipos involucrados en la búsqueda. Nos enfocaremos en el 17% restante, que comprende los equipos con riesgo bajo/medio, medio y alto, ya que presentan un mayor riesgo y requieren una mayor atención.

El gráfico de torta de la Figura 9, ilustra esta distribución: el 83% representa el riesgo bajo (equipos de uso exclusivo), el 7% corresponde al riesgo bajo/medio, mientras que el 5% representa el riesgo medio y otro 5% el riesgo alto.



Figura 9 Grafico de torta Riesgo 2D

### 8.2.3 Complejidad del sistema de limpieza

En la tercera dimensión se evalúa la complejidad del sistema de limpieza- Para ello se analizó la complejidad de los procesos. Los materiales que no requieren limpieza, es decir, los que son descartables después de su uso, se consideraron de riesgo bajo Riesgo:1. Si el proceso de limpieza es automático, el riesgo se clasificó como bajo/medio Riesgo:2. En el caso de procesos semiautomáticos, el riesgo se incrementó a medio Riesgo:3, y para los procesos manuales, el riesgo se consideró medio o alto Riesgo:4.



Del paso anterior, solo quedaron siete grupos de equipos/materiales, son los que mostraron el mayor riesgo de contaminación cruzadas. Para estos equipos, se evaluó la complejidad del sistema de limpieza como se muestra en la Tabla 12

**Tabla 12:** Complejidad del sistema de limpieza

N	Equipo	Puntaje de Riesgo	Valor de Riesgo
1	HPLC	3	Medio
2	AKTA Pilot	3	Medio
3	Fermentadores	4	Medio/Alto
4	Bidones Schott (vidrio)	4	Medio/Alto
5	Bidones PP	4	Bajo /Medio
38	Fermentador del Inóculo	1	Bajo
39	Fermentador de 50 litros	4	Medio/Alto

### 8.2.4 Riesgo General

Una vez evaluadas las tres dimensiones se procede a calcular el Riesgo General. Multiplicando el valor de riesgo obtenido en cada dimensión.

$$\text{Riego General} = R1(\text{A lo largo del proceso}) \times R2(\text{Contaminación cruzada}) \times R3(\text{Complejidad del Sistema})$$

La Tabla 13 muestra un resumen con: los equipos asociados a la producción de las distintas proteínas, sus Riesgo a lo largo del proceso (R1), Riesgo de contaminación Cruzada (R2), Riesgo del Sistema(R3) y el Riesgo General.

Los equipos de dedicación exclusiva fueron excluidos de la evaluación por representar un riesgo de contaminación cruzada bajo.

Los fermentadores tienen un riesgo general bajo, con un puntaje entre 1- 17. Mientras que los HPLC y AKTA, equipos involucrados en los procesos de purificación, obtuvieron un puntaje medio, entre 18- 50 y los Materiales, que se utilizan en todo el proceso productivo, el riesgo fue alto el más alto, entre 53-80.

**Tabla 13.** Puntaje de Riesgo General

N	Equipo	Proteína	R1	R2	R3	Riesgo General	Riego
38	Fermentador de Inóculo	Todas	1	3	1	3	Bajo
39	Fermentador de 50 litros	rhEPO / rhIFN-β1a	1	2	4	8	Bajo
3	Fermentadores	rhEPO / rhIFN-β1a	2	2	4	16	Bajo
1	HPLC	rhEPO / rhIFN-β1a	3	2	3	18	Medio
2	AKTA Pilot	rhEPO / rhFSH / rhIFN-β1a	4	3	3	36	Medio
4	Bidones Schott (vidrio)	Todas	4	4	4	64	Alto
5	Bidones PP	Todas	5	4	4	80	Alto



### 8.3 Inactivación de las Proteínas en Materiales y equipos

La inactivación de proteínas es una condición necesaria para no utilizar el cálculo del MACO en la elección del peor caso. Por ello, es crucial determinar la inactivación de cada proteína en los equipos y materiales identificados en el análisis de riesgo como de riesgo medio a alto.

Luego del análisis de riesgo, se determinó que ENYA solo compartía materiales con el resto de las proteínas. Para facilitar los procesos de inactivación, se decidió que los materiales utilizados para ENYA sean de uso exclusivo. De esta manera, solo se probará la inactivación de rhEPO, rhIFN- $\beta$ 1a y rhFSH con los procedimientos de limpieza en los equipos y materiales seleccionados en el paso anterior (ver Tabla 12).

Se consideraron los parámetros de control Tiempo, Acción, Concentración del agente, y Temperatura (TACT) de los POE de cada equipo y Material. El parámetro Acción, se evaluó el peor caso, en remojo y no se muestra en las tablas de inactivación.

#### HPLC

Este equipo se utiliza en la purificación de proteínas, rhEPO y rhIFN- $\beta$ 1a. Para los HPLC, se evaluó su POE: Operación del Equipo de HPLC (producción), donde detalla los pasos a seguir para su limpieza. El principio de limpieza implica el uso de un gradiente de solventes como acetonitrilo (ACN) y WFI, donde la proteína es atrapada primero en la columna debido a las propiedades de afinidad, y luego es liberada cuando al cambiar gradiente. Este proceso es automático, y se configura como un paso en el equipo. En estas condiciones, la proteína no se desnatura por los solventes de limpieza, ya que el gradiente entre ACN y WFI permite que se adhiera o se libere de la columna utilizada para su purificación. Por esta razón se evaluó el procedimiento de Mantenimiento preventivo. Donde se utiliza para mantenimiento del equipo, una solución de ácido nítrico al 32%, durante 30 minutos.

Para evaluar inactivación se utilizó los parámetros TACT más desfavorables, exposición de 30 minutos, en reposo, Ac Nítrico al 32%, a temperatura ambiente. La concentración de proteína para rhIFN- $\beta$ 1a  $>0.2$  mg/ml y para rhEPO 1 mg/ml. Tabla 14

**Tabla 14.** Inactivación de las proteínas en HPLC

Equipo	Proteína	Tiempo de exposición	Agente del limpieza y concentración	Temperatura	Resultado
HPLC	rhEPO	30 min	Ac Nítrico 32%	TA	Inactivación total
	rhIFN- $\beta$ 1a				Inactivación total

#### AKTA

Este equipo se utiliza en la purificación de tres proteínas: rhEPO, rhFSH y rhIFN- $\beta$ 1a. Se evaluó el POE: Operación del equipo AKTA pilot. En la sección de sanitización, se describe su limpieza que consta de un enjuague con WFI, un tratamiento de 30 minutos con una solución de NaOH al 0.1N, y un enjuague con WFI.



Para evaluar inactivación de las proteínas en el equipo se probó (TACT): por un periodo de 30 minutos, en reposo, hidróxido de sodio a una concentración de 0.1N, a temperatura ambiente. La concentración de las proteínas fue: mayor a 0,1 mg/ml para rhEPO, mayor a 0.2 mg/ml para rhIFN- $\beta$ 1a y mayor a 0.4 mg/ml para rhFSH. Ver tabla 15.

**Tabla 15:** Inactivación de las proteínas en AKTA

Equipo	Proteína	Tiempo de exposición	Agente del limpieza y concentración	Temperatura	Resultado
AKTApilot	rhEPO	30 min	Hidróxido de Sodio 0.1N	TA	Inactivación total
	rhFSH				Inactivación total
	rhIFN- $\beta$ 1a				Inactiva un 83%

## Materiales

Los materiales (bidones de polipropileno o bidones Schott, de vidrio) se utiliza en la producción las tres proteínas: rhEPO, rhFSH y rhIFN- $\beta$ 1a. El riesgo de contaminación cruzada es el más alto porque se utiliza a lo largo del proceso y en todas las proteínas.

Se evaluó el POE: Lavado y acondicionamiento de materiales de producción, este se utiliza para la limpieza de todos los materiales utilizados en la planta. El POE, describe su limpieza Manual: que consta de un enjuague con agua para inyectables (WFI), un tratamiento de 30 minutos con una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.2%, un enjuague con WFI, un tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N, y un enjuague con WFI, todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

Mientras que la limpieza automática: consta de enjuague con WFI, tratamiento de Hidróxido de Sodio 0,1N por 5 minutos a 60°C, y enjuague con WFI.

Para evaluar inactivación de las proteínas en el equipo se probó (TACT).

Lavado Manual: por un periodo de 30 minutos, en reposo, hidróxido de sodio a una concentración de 0.1N, a temperatura ambiente.

Lavado Automático: por un periodo de 5 minutos, en reposo, hidróxido de sodio a una concentración de 0.1N, a una temperatura de 60°C.

La concentración de las proteínas fue: de 0,1 mg/ml para rhEPO, de 0.2 mg/ml para rhIFN- $\beta$ 1a y de 0.2 mg/ml para rhFSH. Ver Tabla 16 con los resultados.

**Tabla 16:** Inactivación de proteínas en Materiales

Equipo	Proteína	Tiempo de exposición	Agente del limpieza y concentración	Temperatura	Resultado
Materiales Manual	rhEPO	30 min	Hidróxido de Sodio 0,1N	TA	Inactivación total
	rhFSH				Inactivación total
	rhIFN- $\beta$ 1a				Inactiva un 83%
Materiales Automáticos	rhEPO	5 min	Hidróxido de Sodio 0,1N	60°C	Inactivación total
	rhFSH				Inactivación total
	rhIFN- $\beta$ 1a				Inactivación total



## AKTApilot y Materiales

Como rhIFN- $\beta$ 1a, una de las proteínas que está en contacto con los AKTApilot y Materiales, no se inactiva en las condiciones probadas, se modificaron variables del TACT para probar inactivación total.

Para los materiales, el procedimiento de limpieza consta de una sanitización con hipoclorito de sodio al 0,2% por 30 minutos, seguido de enjuague y despirogenado con hidróxido de Sodio 0,1N por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para los AKTApilot, se consultó con el fabricante que aconsejó el uso hipoclorito de sodio a una concentración no mayor al 10%.

Por todo lo anterior expuesto se decidió probar:

- 60 minutos, hidróxido de sodio a una concentración de 0,1N, a temperatura ambiente.
- 30 minutos, hidróxido de sodio a una concentración de 0,5N, a temperatura ambiente.
- 30 minutos, hipoclorito de sodio a una concentración de 0,2%, a temperatura ambiente.

La concentración de las proteínas fue de 0.2 mg/ml para rhIFN- $\beta$ 1a . Los resultados se exponen en la Tabla 17.

**Tabla 17:** Inactivación de INF en AKTA y materiales lavado Manual

Equipo	Proteína	Tiempo de exposición	Agente del limpieza y concentración	Temperatura	Resultado
AKTApilot y Materiales	rhIFN $\beta$ 1a	60 min	Hidróxido de Sodio 0,1N	TA	Inactiva 84%
		30 min	Hidróxido de Sodio 0,5N		Inactiva 85%
		30 min	Hipoclorito de Sodio 0,2%		Inactivación 100%

### 8.3.1 Resumen de Inactivación

Para los equipos y materiales considerado de riesgo moderado a alto se consiguió una inactivación del 100% de todas las proteínas, las siguientes condiciones se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18:** Resumen de Inactivación

Equipo	Proteína	Agente de limpieza	Concentración	Tiempo de exposición	Temperatura	Resultados obtenidos
HPLC	rhEPO	Ac. Nítrico	32%	30 min	T.A.	Se inactiva
	rhIFN- $\beta$ 1a	Ac. Nítrico	32%	30 min	T.A.	Se inactiva
AKTA	rhEPO	NaOH	0,1N	30 min	T.A.	Se inactiva
	rhFSH					Se inactiva
	rhIFN- $\beta$ 1a	Hipoclorito de sodio	0.2%	30 min	T.A.	Se inactiva
Bidones Schott	rhEPO	NaOH	0,1N	30 min	T.A.	Se inactiva
	rhFSH					Se inactiva
	rhIFN- $\beta$ 1a	Hipoclorito de sodio	0.2%	30 min	T.A.	Se inactiva
Bidones PP (Manual)	rhEPO	NaOH	0,1N	30 min	T.A.	Se inactiva
	rhFSH					Se inactiva
	rhIFN- $\beta$ 1a	Hipoclorito de sodio	0.2%	30 min	T.A.	Se inactiva



De lo expuesto fue necesario:

- 1- Modificar el procedimiento para la limpieza de HPLC, se incluyó el uso del Ácido Nítrico 32% por 30 minutos.
- 2- En el procedimiento de limpieza de los AKTApilot, incluir el uso de hipoclorito de sodio 0,2% por 30 minutos.

El lavado manual no sufre modificaciones.

## 8.4 Producto, Peor Caso

Una vez demostrada la inactivación completa de cada proteína con los procedimientos de limpieza en los equipos y materiales con riesgo moderado y alto, se evaluó cuál de los diferentes productos es el elegido, como peor caso para realizar la validación de limpieza, utilizando el Índice Peor Caso, WCI.

Los factores que se tuvieron en cuenta son solubilidad, facilidad de limpieza y ocupación de la línea de producción. Se formó un grupo de trabajo interdisciplinario para llevar a cabo la elección del producto para la validación de limpieza, integrado por personal del área de Producción, Control de Calidad, Desarrollo y Validaciones y Calificación.

### 8.4.1 Solubilidad $f_s$

Se decidió categorizar todas las proteínas con la puntuación muy soluble. Esto se debe a que la mayoría de los productos biofarmacéuticos, entre los cuales se encuentran la Eritropoyetina(rhEPO) humana recombinante solución concentrada, el Interferón beta la solución concentrada (rhIFN- $\beta$ 1a) y la Folitropina solución concentrada, son solubles en soluciones acuosas. La solubilidad se refiere al proceso por el cual estos productos se disuelven en un solvente para formar una solución homogénea manteniendo una estructura correctamente plegada y estable en el tiempo (normalmente dos años o más). Este hecho está fundamentado en que la base de la formulación es acuosa (más del 90% p/p). En ausencia de otros componentes de la formulación, estos productos perderán su conformación tridimensional característica y se desnaturalizarán con la consiguiente pérdida de actividad biológica y terapéutica. Esta es la razón por la cual, no se dispone de datos bibliográficos acerca de la solubilidad de cada una de estas sustancias en agua pura, dado que no son estables y no mantienen su integridad estructural en ese solvente (Vihinen,2020).

Aún más, normalmente se asume que la solubilidad de cada uno de estos productos en agua pura es lo suficientemente alta como para permitir una elevada remoción al realizar el enjuague con agua. En la Tabla 19 se muestra el puntaje asignado.

**Table 19:** Ponderación del riesgo involucrado en la solubilidad

Solubilidad ( $f_s$ )	Categorías	Descripción
g soluto/ 100 ml agua	3	Muy soluble (99-100% en agua). Todas las proteínas tienen una solubilidad del 99 al 100%
	2	Escasamente soluble (entre 10% a 90%)
	1	Casi insoluble (< 0,01% en agua)



#### 8.4.2 Dificultad de limpieza $f_D$

Se realizaron encuestas sobre la dificultad de la limpieza en función de las proteínas. A los operarios de purificación y de lavadero que realizan la limpieza de los equipos y materiales. Personal de lavadero, se encuentra integrado por ocho personas, con una experiencia en el área entre dos a quince años. En lavadero, el material llega con una etiqueta que identifica si estuvo en contacto con el producto o no, pero no se pueden identificar con que proteína estuvo en contacto. Por lo tanto, el personal no puede discernir grado de dificultad entre proteínas, solo puede dar grado de dificultad entre distintos materiales. Las preguntas se muestran en la Tabla 20. Donde todos respondieron que pueden identificar si el material estuvo en contacto con la proteína.

**Tabla 20:** Preguntas y % de respuestas

Personal	Pregunta	Resultado:
8	¿Puede identificar si el material estuvo en contacto con proteína?	Si (100% de las respuestas)
8	¿Puede identificar que proteína?	No (100% de las respuestas)
8	¿Hay diferencia en el lavado entre proteínas?	No (100% de las respuestas)

Como el personal de lavadero no puede discernir que proteína estuvo en contacto con el material, con el equipo de trabajo se decidió categorizar la dificultad de limpieza de los materiales como fácil por la estrecha relación que tiene la dificultad de limpieza con la solubilidad de las proteínas, y todas las proteínas son muy solubles.

El personal de Purificación se encuentra integrado por 5 personas, altamente capacitadas en los procedimientos de operación de los diferentes equipos en el área, experiencia laborar en el sector entre 5 a 10 años, y todos poseen título habilitante de técnico químico.

HPLC: Las preguntas sobre la dificultad de limpieza para este equipo se realizaron a los operarios luego de la modificación del POE de limpieza con la incorporación del Ácido Nítrico al proceso y del Hipoclorito de sodio 0.2% en los AKTAs. Tanto la introducción de Ácido Nítrico en el HPLC y el Hipoclorito de sodio en el AKTA entre campaña, se agregaron como agente de inactivación para mejorar la limpieza de los equipos. Los resultados de las encuestas se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21:** Purificación preguntas y %respuestas

Personal	Equipo	Pregunta	Resultado %
5	HPLC	Puede diferenciar que proteína purifica el equipo	Si (100% de las respuestas)
		Hay diferencia en la dificultad de limpieza entre proteínas	No, (100% de las respuestas)
5	AKTA	Puede diferenciar que proteínas purifica el equipo	Si, (100% de las respuestas)
		Hay diferencia en la dificultad de limpieza entre proteínas	No, (100% de las respuestas)

Se consideró que las respuestas por parte del personal de Purificación son válidas; no encuentran diferencias en la limpieza de los diferentes equipos entre las diferentes proteínas.

Conclusión, el resultado final de la evaluación de equipos y materiales, se le asignó el puntaje 1, Fácil de limpiar, a todas las proteínas evaluadas. El resultado se muestra en la Tabla 22.



**Tabla 22:** Ponderación del riesgo involucrado en la Dificultad de limpieza

Dificultado de limpieza ( $f_D$ )	Categorías	Descripción
Producto más difícil de limpiar (basado en estudio de laboratorio o subjetiva experiencia en planta)	1	Fácil
	2	Medio
	3	Difícil

### 8.4.3 Ocupación en línea $f_O$

Se evaluó la cantidad de lotes realizados por proteínas. Debido a que el proceso es muy largo, el cambio de producto entre campaña es muy bajo. Además, rhFSH e rhIFN- $\beta$ 1a se fabrican irregularmente. Por esta razón se realizó un promedio de los 4 últimos años, desde la última validación de limpieza realizada en el 2020. (Tabla23)

**Tabla 23:** Promedio de lotes producidos en S1

Producción por Año	EPO	FSH	INF
2020	3	N/A	2
2021	9	N/A	2
2022	8	4	2
2023	12	0	0
Promedio por año	8	2	2

Para ponderar cada categoría se agrupó en rangos. Como resultando se le asignó la categoría 1 al promedio entre 1 a 2 lotes por año, la categoría 2 al promedio entre 2 a 5 lotes por años y la categoría 3 al promedio entre 5 a 8 lotes por años. Los resultados se detallan en la Tabla 24.

**Tabla 24:** Ponderación del riesgo involucrado en la Ocupación en línea

Factor de ocupación en la línea ( $f_O$ )	Categorías	Promedio lotes/año
factor de ocupación	1	1-2 (rhFSH y rhIFN- $\beta$ 1a)
	2	3-5
	3	6-8 (rhEPO)

### 8.4.4 Cálculo del WCI y elección del Producto

Una vez obtenidos los puntajes de cada proteína para los diferentes factores o variables, como solubilidad, dificultad de limpieza y ocupación en línea; se proceda al cálculo del WIC, que es el índice del peor caso, utilizando la ecuación 6.

$$WCI = \frac{f_o \times f_d}{f_s}$$

En esta ecuación, se multiplican los factores de facilidad de limpieza y ocupación en línea, y el resultado se divide por el factor de solubilidad. En la Tabla 25 se muestran los



resultados obtenidos, donde se observa que rhEPO es la proteína con el mayor WCI. Esto se debe a que la rhEPO se produce con mayor frecuencia, por lo que los procedimientos de limpieza se utilizan principalmente para la eliminación de esta proteína en comparación con cualquier otra.

**Tabla 25.** Matriz de Peor Caso

Matriz de Peor Caso				
Proteína	( <i>f<sub>D</sub></i> )	( <i>f<sub>S</sub></i> )	( <i>f<sub>O</sub></i> )	$WCI = (f_D * f_O) / f_S$
rhIFN-β1a	1	3	1	0,33
rhEPO	1	3	3	1,00
rhFSH	1	3	1	0,33



## 9. Discusión y conclusiones

Elegir un producto representativo para la validación de limpieza no solo es práctico desde el punto de vista operacional, sino también desde el económico, ya que validar todos los productos en una línea de producción sería muy costoso y llevaría mucho tiempo.

Al planificar este trabajo, se planteó la hipótesis: La selección del producto más representativo en una línea multiproducto de una industria farmacéutica de productos biotecnológicos permitirá una validación de limpieza eficiente y efectiva, garantizando la minimización del riesgo de contaminación cruzada. Para probar esta hipótesis, se estableció un objetivo general: desarrollar un proceso para evaluar, identificar y priorizar el producto "peor caso" en una industria de fármacos de origen biotecnológico, que difiere de la industria farmacéutica tradicional de fármacos de origen sintético.

Esta diferencia es crucial, ya que los productos biotecnológicos pueden perder su actividad biológica después del proceso de limpieza. Esta particularidad es relevante porque uno de los parámetros tradicionalmente utilizados para determinar el "peor caso" en la industria farmacéutica es el cálculo del MACO (Maximum Allowable Carryover), que es el máximo arrastre permitido sin comprometer la calidad o la seguridad del producto final. Este cálculo se realiza para cada producto de la línea de producción. Sin embargo, para su cálculo es indispensable que el producto conserve su actividad luego del proceso de limpieza. Si se demuestra que los productos de la línea pierden su actividad, resulta irrelevante calcular el MACO.

Por lo tanto, la elección del producto para realizar la validación debe enfocarse en otras características, como su solubilidad, facilidad de limpieza y ocupación en la línea (Porto et al, 2016).

En este contexto, se evaluaron las regulaciones vigentes y su evolución en el tiempo para poder abordar las estrategias planteadas. Estas estrategias están respaldadas por la literatura y por entes reguladores nacionales e internacionales vigentes que apoyan este razonamiento científico. Se realizó una evaluación de riesgo minuciosa y metódica del sistema para asegurar la correcta elección del producto.

Primero, se agruparon todos los equipos y materiales que entran en contacto con las proteínas producidas en la línea, definiendo así el alcance de la validación de limpieza en cuanto a equipos y materiales involucrados. Cada grupo comparte características similares y métodos de limpieza. Esta actividad arrojó un total de 41 grupos de equipos y materiales, con características distintas y métodos de limpieza diversos.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de riesgo en tres dimensiones para determinar cuáles de estos grupos de equipos y materiales presentaban las condiciones más riesgosas en función de la contaminación cruzada entre proteínas. Este análisis permitió reducir el número de equipos y materiales a evaluar en un 83%, es decir, de los 41 grupos iniciales solo se evaluaron 7 grupos, concentrándonos en aquellos considerados de riesgo moderado a alto para evaluar la inactivación de las proteínas con sus respectivos procedimientos de limpieza.



Se evaluó que las proteínas que presentaban mayor riesgo de contaminación cruzada en la línea eran rhEPO, rhIFN- $\beta$ 1a y rhFSH, definiendo así los IFA de la línea de producción. ENYA solo presentaba un riesgo menor de contaminación cruzada porque compartía materiales con las otras proteínas, por lo que se decidió que el material utilizado para la producción de ENYA fuera de uso exclusivo.

Luego, se procedió a evaluar las condiciones de limpieza más adversas para este grupo de equipos y materiales, con el objetivo de lograr la inactivación de residuos proteicos después del proceso de limpieza. Se realizaron modificaciones a los procedimientos para garantizar la inactivación total, respaldada en el conocimiento del grupo de trabajo y en consulta con los fabricantes de los equipos.

Finalmente, una vez determinada la inactivación, se llevó a cabo un análisis de riesgo para la identificación del producto "peor caso", considerando la solubilidad de las proteínas, la dificultad de limpieza de los equipos y materiales, así como la ocupación del producto en la línea de producción. La ocupación del producto en la línea de producción resultó ser el factor determinante en la elección del producto.

Luego de evaluar cada una de las proteínas producidas en la misma línea de producción, rhEPO resultó ser el producto que representa el mayor riesgo de contaminación cruzada, por ser el único producto producido en los últimos dos años en la línea. Esta elección simplifica el proceso de validación, aumenta la factibilidad de realización y reduce costos y tiempo.

En resumen, la hipótesis planteada es verdadera. Dado que todas las proteínas presentan el mismo grado de solubilidad y dificultad para limpiar, rhEPO resulta ser la proteína que más tiempo pasa en contacto con los equipos de la línea, lo que implica que los procesos de limpieza se utilizan con mayor frecuencia para esta proteína, convirtiéndola en el producto más representativo para realizar la validación de limpieza.

La implementación de esta nueva estrategia en la elección del "peor caso" para realizar la validación de limpieza representa un avance significativo, no solo en términos de eficiencia operativa y cumplimiento regulatorio, sino también en la garantía de la integridad y calidad del proceso de fabricación. Además, esta estrategia es económicamente ventajosa para la empresa, ya que reduce costos y tiempo al simplificar el proceso de validación.



## 10. Bibliografía:

1. ANMAT. Disposición 4159/2023 [Internet]. Argentina.gob.ar. [citado el 13 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-4159-2023-385329>
2. European Medicines Agency. Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities. European Medicines Agency; 2014 [consultado 13 de enero 2023]. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-setting-health-based-exposure-limits-use-risk-identification-manufacture-different_en.pdf);
3. FDA: Guide to inspections validation of cleaning processes. Validation of Cleaning Processes. Obtenido de US Food and Drug Administration: 26 de Aug de 2014. [Consultado noviembre 2022] Disponible en: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/validation-cleaning-processes-793>
4. Forno G, Oggero M. Glicoproteínas terapéuticas: Diseño, expresión en células de mamífero y análisis de sus glicanos. Ediciones UNL; 2021. P.151-199
5. International Society for Pharmaceutical Engineering. ISPE, Guide Cleaning Validation Life-Applications, Methods, and Controls. ISPE,2020. [Consultado el septiembre 2022] Disponible en: <https://www.ISPE.org>.
6. Oliver J. A 3-D Risk Assessment Model. Journal of Validation Technology. 2008;14(1):70-76. Disponible en: <https://www.ivthome.com>
7. Parenteral Drug Association (PDA). PDA Technical Report No. 49: Points to consider for Biotechnology Cleaning Validation. PDA, 2010. [Consultado el 20 de Noviembre 2022] Disponible en: <https://www.pda.org>
8. Pharmaceutical Inspection Convention; Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. PE 009-17 Annexe 15, (220-222) PIC/s,25 August 2023 [Consultado el 20 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://picscheme.org>
9. Porto L V Fe M, Fukumori N T O, Matsuda M M N. Determination of the worst case for cleaning validation of equipment used in the radiopharmaceutical production of lyophilized reagents for 99mTc labeling. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016;52(1):105-112. DOI: 10.1590/S1984-82502016000100012
10. Sharnez R, Spencer A, Bussiere J, Mytych D, To A, Tholudur A. Biopharmaceutical Cleaning Validation: Acceptance Limits for Inactivated Product Based on Gelatin as a Reference Impurity. Journal of Validation Technology. 2013 [Consultado enero 2023]; 2013:70-76. Disponible en: <https://www.ivthome.com>



11. Vihinen M. Solubility of proteins. *ADMET & DMPK*. 2020;8(4):391–399. DOI: 10.5599/admet.831
12. Walsh A, Almann T. Replacing the MAC/MACO with the MSC: Rethinking how Cleaning Validation Limits are Calculated. [Internet].[Consultado el 3 Noviembre 2022]Outsourced Pharma. Disponible en:  
<https://www.outsourcedpharma.com/doc/replacing-the-mac-maco-with-the-msc-rethinking-how-cleaning-validation-limits-are-calculated-0001>
13. ChatGPT. OpenAI. Recuperado de <https://openai.com/chatgpt>