



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL PROCESAMIENTO ASÉPTICO EN PRODUCTOS
BIOTECNOLÓGICOS**

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MIROSLAVA GUADALUPE, GONZÁLEZ MONTIEL



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: INÉS FUENTES NORIEGA**

VOCAL: **Profesor: LAURO MISAEAL DEL RIVERO RAMÍREZ**

SECRETARIO: **Profesor: CARLOS HUESCA RODRÍGUEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO**

2° SUPLENTE: **Profesor: JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**EDIFICIO H, MARIO MOLINA, CIRCUITO MARIO DE LA CUEVA S/N, COYOACÁN, C.U.,
04510 CIUDAD DE MÉXICO, CDMX.**

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. CARLOS HUESCA RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE:

MIROSLAVA GUADALUPE GONZÁLEZ MONTIEL

1. Índice

1.	Índice.....	3
2.	Índice de Figuras	5
3.	Índice de Tablas	5
4.	Lista de Abreviaturas.....	6
5.	Glosario.....	8
6.	Introducción.....	14
7.	Objetivo General.....	15
8.	Objetivos Particulares.....	15
9.	Productos Biotecnológicos	16
	I. Definición.	16
	II. Proceso de fabricación general de productos biotecnológicos....	17
	III. Contaminantes comunes	22
10.	Validación del Procesamiento Aséptico	25
	I. Fuentes de Contaminación Comunes	25
	II. Operaciones unitarias implicadas en el PA	29
	a. Áreas	30
	b. Sistemas críticos.....	33
	c. Esterilización del producto y demás componentes.....	41
	d. Integridad del sistema contenedor-cierre.	43
	e. Limpieza y esterilización de equipos	45

f.	Calificación de Personal	48
g.	Control Ambiental	51
III.	Filtración Aséptica	54
IV.	Llenado Aséptico	56
I.	Sistemas de Barrera de Acceso Restringido (RABS)	57
II.	Soplado-Llenado-Sellado (BFS)	58
III.	Aisladores	59
IV.	Simulación de Procesamiento Aséptico (SPA)	62
11.	Discusión	72
12.	Conclusiones	75
13.	Referencias	76

2. Índice de Figuras

Ilustración 1 Proceso de Producción “agua arriba” o “upstream” adoptado en compañías biotecnológicas para el proceso fabricación de mAb.	20
Ilustración 2 Proceso de Producción “agua abajo” o “downstream” que se utiliza a menudo para la producción de mAb.	21
Ilustración 3 Factores principales que influyen en el riesgo de contaminación microbológica de los productos biotecnológicos.	28
Ilustración 4 Diagrama de flujo para la SPA.	63

3. Índice de Tablas

Tabla 1 Contaminantes microbianos comunes en procesos biotecnológicos.	27
Tabla 2 Consideraciones para elegir el Tamaño de las corridas de SPA.	66
Tabla 3 Criterios de Aceptación para las pruebas de llenado simulado.	70
Tabla 4 Elementos necesarios a considerar para la correcta Validación del Procesamiento Aséptico en la Fabricación de Productos Biotecnológicos.	74

4. Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

BFS: Blow-Fill-Seal por sus siglas en inglés, que significa Soplado-Llenado-Sellado.

CDR: Complementarity Determining Region por sus siglas en inglés, que significa Región Determinante de la Complementariedad.

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

DF: Diafiltración.

EMA: European Medicines Agency por sus siglas en inglés, que significa Agencia Europea de Medicamentos.

ET: Esterilización Terminal.

Fc: Fragmento Cristalizable.

FDA: Food and Drug Administration por sus siglas en inglés, que significa Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

GMP: Good Manufacturing Practices por sus siglas en inglés, que significa Buenas Prácticas de Manufactura.

HEPA: High Efficiency Particulate Air por sus siglas en inglés, que significa Atrapador de Partículas de Alta Eficiencia.

HVAC: Heating, Ventilation and Air Conditioning por sus siglas en inglés, que significa Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado.

HVR: Hypervariable Region por sus siglas en inglés, que significa región hipervariable.

ISO: International Organization for Standardization por sus siglas en inglés, que significa Organización Internacional para la Estandarización.

mAb: Monoclonal Antibody por sus siglas en inglés, que significa Anticuerpo Monoclonal.

NAE: Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: Procesamiento Aséptico.

Pa: Pascal, unidad de presión del Sistema Internacional de Unidades.

pH: Potencial de Hidrógeno.

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación.

QRM: Quality Risk Management por sus siglas en inglés, que significa Gestión de Riesgos de Calidad.

RABS: Restricted Access Barrier Systems por sus siglas en inglés, que significa Sistemas de Barrera de Acceso Restringido.

SPA: Simulación de Proceso Aséptico.

UF: Ultrafiltración.

WFI: Water For Injection por sus siglas en inglés, que significa Agua Para la Fabricación de Inyectables.

5. Glosario

Anticuerpo monoclonal (mAb): Población de anticuerpos homogéneos obtenida de un solo clon de linfocitos o mediante tecnología recombinante y que se une a un solo epítipo.

Área aséptica: Área diseñada, construida y mantenida con el objeto de tener dentro de límites preestablecidos el número de partículas viables y totales en superficies y medio ambiente.

Área autocontenida: Área completa y separada en los aspectos de operación, incluyendo flujos de personal y equipos. Esto incluye barreras físicas, así como sistemas de aire independientes, aunque no necesariamente implica dos edificios distintos ni separados.

Banco Celular de Trabajo: Al que se prepara de alícuotas de una suspensión homogénea de células obtenidas de cultivar el Banco Celular Maestro bajo condiciones de cultivo definidas.

Banco Celular Maestro: Alícuota de una colección celular que en su desarrollo ha sido preparada de las células clonadas bajo condiciones definidas, contenida dentro de múltiples envases y almacenada bajo condiciones específicas.

Biofármaco: Toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico.

Bioproceso Aguas Arriba (Upstream): El proceso aguas arriba se define como el crecimiento microbiano requerido para producir biotecnológicos u otras biomoléculas e involucra una serie de eventos que incluyen la selección de la línea celular, los medios de cultivo, los parámetros de crecimiento y la optimización del proceso para lograr

condiciones óptimas para el crecimiento celular y la producción biotecnológica.

Bioproceso Aguas Abajo (Downstream): El procesamiento aguas abajo incluye todos los pasos necesarios para purificar un producto biológico desde el caldo de cultivo celular hasta el producto purificado final. Involucra múltiples pasos para capturar la biomolécula diana y eliminar las impurezas relacionadas con la célula huésped (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, etc.), impurezas relacionadas con el proceso (por ejemplo, tampones, ligandos lixiviados, antiespumante, etc.) e impurezas relacionadas con el producto (ej., agregados, fragmentos, especies recortadas, etc.).

Calificación: Realización de las pruebas específicas basadas en conocimiento científico, para demostrar que los equipos, sistemas críticos, instalaciones, personal y proveedores cumplen con los requisitos previamente establecidos, la cual debe ser concluida antes de validar los procesos.

Campaña de fabricación: Fabricación de una serie de lotes del mismo producto en un periodo definido de tiempo seguido por actividades de limpieza y, en su caso, de sanitización, antes de pasar a otro producto. Los productos diferentes no son producidos al mismo tiempo, pero si utilizando el mismo equipo.

Carga biológica: Nivel y tipo (objetable o no) de microorganismos presentes en materias primas, medios, sustancias biológicas, productos intermedios o productos terminados. Considerado como contaminación cuando el nivel y/o tipo excede las especificaciones.

Capacitación: Actividades encaminadas a generar o desarrollar habilidades en el personal.

Contaminación: Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables.

Contaminación cruzada: Presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, procedentes de un proceso o producto diferente.

Contaminante: Impurezas indeseables de naturaleza química o microbiológica, o de materia extraña, presentes en un insumo, producto intermedio y/o producto terminado.

Control de cambios: Evaluación y documentación de cualquier cambio que pudiera impactar en la calidad del producto.

Control en proceso: Verificaciones realizadas durante la fabricación para el seguimiento, y de ser necesario, ajuste del proceso.

Criterios de aceptación: Especificaciones, estándares o intervalos predefinidos que deben cumplirse bajo condiciones de prueba preestablecidas.

Despirogenado: un proceso utilizado para destruir o eliminar los pirógenos (por ejemplo, endotoxina).

Desviación o no conformidad: Al no cumplimiento de un requisito previamente establecido.

Especificación: Descripción de un material, sustancia o producto, que incluye los parámetros de calidad, sus límites de aceptación y la referencia de los métodos a utilizar para su determinación.

Esterilidad: La ausencia de todo organismo viable de cualquier índole, en un producto que ostenta la cualidad de ser estéril. Esta es una condición absoluta.

Fabricación: Operaciones involucradas en la elaboración o producción de un medicamento desde la recepción de insumos, liberación, almacenamiento y distribución como producto terminado.

Fermentación: Mantenimiento o propagación de células microbianas in vitro. La fermentación se opera y progresa en condiciones axénicas para garantizar un cultivo puro sin microorganismos contaminantes.

Inactivación: Eliminación o reducción a un límite aceptable de infectividad de microorganismos o desintoxicación de toxinas por modificación química o física.

Inactivación viral: Eliminación de la actividad viral, a través de un método químico o físico.

Limpieza: Proceso para la disminución de partículas totales a niveles establecidos.

Línea celular: Tipo de población celular con características definidas que se originaron por subcultivos seriados de una población celular primaria.

Llenado aséptico simulado: Operación de llenado utilizando medio de cultivo en lugar de producto, poniéndolo en contacto con las superficies del equipo, sistemas de cierre, ambiente y operaciones del proceso para reproducir las condiciones de operación.

Lote semilla de trabajo: Cultivo de un microorganismo derivado de un lote de semilla maestro o de un lote de semilla intermedio. Está destinado a un uso en producción.

Lote semilla maestro: Cultivo de un microorganismo derivado del lote de semilla pre-maestro, distribuido en contenedores en una sola operación, de manera que garantice la homogeneidad y la estabilidad, y prevenga cualquier contaminación.

Partículas viables: Cualquier partícula que bajo condiciones ambientales apropiadas puede reproducirse.

Peor caso: Condición o conjunto de condiciones que abarcan límites y circunstancias superiores y/o inferiores de proceso, dentro de procedimientos normalizados de operación, que poseen la mayor oportunidad de falla en el proceso cuando se compara con condiciones ideales. Tales condiciones no inducen necesariamente a fallas en el producto o proceso.

Pirógeno: Sustancia que induce una reacción febril en un paciente.

Producción: Operaciones involucradas en el procesamiento de insumos para transformarlos en un producto a granel.

Producto a granel: Producto en cualquier etapa del proceso de producción antes de su acondicionamiento primario.

Producto Biotecnológico: También llamado **Medicamento Biotecnológico**, es toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

Producto intermedio: Material obtenido durante etapas de la producción antes de convertirse en un producto a granel.

Producto semiterminado: Producto que se encuentra en su envase primario y que será sometido a etapas posteriores para convertirse en producto terminado.

Producto terminado: Medicamento en su presentación final.

Programa de monitoreo ambiental: Establecimiento de una secuencia cronológica de actividades para evaluar el cumplimiento de

los parámetros establecidos de partículas viables y totales en un ambiente controlado.

Recolección o Cosecha: procedimiento mediante el cual se recuperan las células, cuerpos de inclusión o sobrenadantes crudos que contienen el ingrediente activo no purificado.

Sanitización: Acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos, posterior a la actividad de limpieza.

Sistema contenedor cierre: Conjunto de materiales de empaque que contienen y protegen a la forma farmacéutica. Incluye tanto al envase primario como al secundario, si este último cumple la función de proporcionar protección adicional al producto.

Sistema vector-hospedero: Elemento genético capaz de introducir ácido desoxirribonucleico y causar su replicación y expresión en una célula hospedera.

Sistemas críticos: Aquéllos que tienen impacto directo en los procesos y productos.

Validación: Evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científicas de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, a lo largo de todo el ciclo de vida de un producto, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad, consistencia y robustez de un proceso dado en cuanto a su capacidad para entregar un producto de calidad.

Validación de limpieza: Evidencia documentada de que un procedimiento de limpieza para las áreas y equipos usados en la fabricación de medicamentos reduce a un nivel preestablecido los residuos del agente de limpieza y producto procesado.

6. Introducción

El Procesamiento Aséptico (PA) permite preservar la esterilidad de un medicamento que es ensamblado a partir componentes estériles y sólo es utilizado en productos que no resisten la esterilización terminal (ET), como los productos biotecnológicos.

A causa de la utilización de técnicas de propagación celular en la producción de biomoléculas y por ende el uso de componentes promotores del crecimiento durante el proceso de fabricación, el riesgo de contaminación microbiana se encuentra implícito en dicho proceso, por consiguiente, es imprescindible que la producción se lleve a cabo bajo estrictas técnicas asépticas a través del PA.

El PA es uno de los procesos más críticos involucrados en la fabricación de los productos biotecnológicos. Este requiere un estricto control, principalmente en las etapas de cultivo celular y llenado. Así, para garantizar la esterilidad en todo el lote de biomedicamento es indispensable la validación del PA, pues a través de esta se demuestra o asegura que las técnicas asépticas y las medidas de control son ejecutadas de manera óptima.

Debido a lo anterior, por motivo de la naturaleza de los productos biotecnológicos, así como el riesgo inherente de contaminación durante su proceso de fabricación, es necesario establecer los requerimientos básicos de la validación del PA en la fabricación de los productos biotecnológicos con fundamento en el marco regulatorio nacional e internacional con el propósito de garantizar la seguridad y eficacia de los productos biotecnológicos.

7. Objetivo General

Proporcionar una guía con los aspectos básicos involucrados en la validación del Procesamiento Aséptico durante la fabricación de productos biotecnológicos contemplando la regulación nacional e internacional, así como estudios de investigación científica.

8. Objetivos Particulares

- Utilizar como caso específico de producto biotecnológico anticuerpos monoclonales, obtenidos a través de líneas celulares de mamíferos en presentación líquida.

9. Productos Biotecnológicos

I. Definición.

Se consideran productos biotecnológicos, aquellos alimentos, ingredientes, aditivos, materias primas, insumos para la salud, plaguicidas, sustancias tóxicas o peligrosas, y sus desechos, en cuyo proceso intervengan organismos vivos o parte de ellos, modificados por técnica tradicional o ingeniería genética. Dentro de insumos para la salud se encuentran, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, entre otros.²¹

Los biotecnológicos son, por lo general, moléculas grandes y altamente complejas, debido a sus características estructurales y funcionales particulares, derivadas de células u organismos vivos.¹⁶ Los anticuerpos monoclonales (mAb) son moléculas de unión con una alta especificidad hacia su objetivo y son herramientas indispensables en la investigación, el diagnóstico y la terapia.¹⁷

Las terapias de anticuerpos monoclonales han sido aprobadas para más de 30 objetivos y enfermedades como esclerosis múltiple, trastornos inmunológicos como la artritis reumatoide y la psoriasis y principalmente el cáncer. Los anticuerpos se han convertido en la nueva columna vertebral de la industria farmacéutica, que anteriormente dependía de moléculas pequeñas. En comparación con dichas moléculas, los mAb cuentan con alta selectividad de diana y, por lo tanto, menos toxicidad (como resultado de la unión con otros objetivos).²⁹ Hasta 2017 la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) han aprobado 76 anticuerpos monoclonales para uso terapéutico, mientras que en México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) cuenta con 9 anticuerpos monoclonales innovadores hasta enero de 2018.^{3,4}

La producción de mAb en su mayoría es basada en mamíferos, debido a que estos sistemas poseen la capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales y, por lo tanto, son idóneas en la producción de proteínas complejas que requieren mayor nivel de procesamiento postraduccionales como plegamientos, carboxilación, glicosilación, unión de subunidades, etc. ¹⁵ Las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) o de mieloma de ratón (NS0, SP2 / 0) son las líneas celulares huésped más utilizadas actualmente para los productos comercializados y en menor medida las bacterias gramnegativas, que se usan en la fabricación biotecnológica para producir productos de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) recombinante, como proteínas terapéuticas, que no requieran modificaciones postraduccionales. La selección del sistema de expresión está determinada por su capacidad para ofrecer una alta productividad, cumpliendo los atributos de calidad de producto.^{6,11}

II. Proceso de fabricación general de productos biotecnológicos.

La mayoría de los mAb terapéuticos disponibles en la actualidad están diseñados genéticamente como, por ejemplo, trastuzumab y bevacizumab, anticuerpos humanizados, donde la secuencia de proteínas de un anticuerpo humanizado es esencialmente idéntica a la de una variante humana, a pesar del origen no humano de algunos de sus segmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR) responsables de la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno diana. Para llevar a cabo la humanización de los anticuerpos se pueden efectuar varias técnicas, la más importante se basa en la inserción de CDR de interés en un marco de anticuerpos humanos, así los anticuerpos "humanizados" resultantes contienen 85-90% de secuencias humanas. La inserción de los segmentos de codificación de CDR adecuados permite propiedades de unión deseadas y la estructura de anticuerpo humano garantiza, en cierta medida, baja inmunogenicidad. Para conseguir el mAb

se utilizan técnicas como ADN recombinante que implica uso de un vector apropiado con expresión en células de mamíferos.⁸

La fabricación industrial de anticuerpos farmacéuticos es una tarea compleja que requiere un esfuerzo considerable.

La producción a gran escala de mAb utiliza sistemas de producción de mamíferos seguidos de la eliminación y purificación de células mediante cromatografía secuencial y etapas de filtración por membrana, para reducir constantemente las impurezas del producto (como variantes de proteínas) y no relacionadas con el producto (por ejemplo, proteínas de la célula huésped) a niveles aceptables.¹

Después de obtener la mejor selección tanto de líneas celulares como de clones, es decir, la adecuada combinación para la producción de anticuerpos durante la etapa de desarrollo, se da paso a los procesos de cultivo celular a gran escala.¹⁸

El proceso de fabricación biotecnológica "agua arriba" o "upstream" comienza con el crecimiento del inóculo después de la descongelación del vial, este se realiza en matraces de agitación o matraces giratorios, que aumentan progresivamente en tamaño y/o volumen, en esta etapa del proceso suelen emplearse biorreactores desechables. La masa celular se escala a través de varias etapas antes de ser transferida al biorreactor de producción, donde la producción de "lote alimentado" es la más frecuente e implica la adición de pequeños volúmenes de alimento para complementar los nutrientes presentes en el biorreactor a medida que incrementa el crecimiento celular y por ende la producción del producto, el medio que contiene los metabolitos es retirado una vez finalizada cada corrida. El oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la transferencia de masa de oxígeno y dióxido de carbono son controladas en el biorreactor de producción. Por otro lado, el cultivo celular de perfusión es aquel en donde las células se retienen en el biorreactor y los nuevos medios son

alimentados continuamente, este es empleado en menor medida en los procesos, debido a los desafíos implicados en el mantenimiento de la esterilidad durante largos períodos de tiempo. En la Ilustración 1 se muestra un diagrama de proceso de producción en sentido “agua arriba” o “upstream” adoptado en compañías biotecnológicas para el proceso fabricación de mAb.

Un componente usual de los medios de cultivo celular son los hidrolizados de levadura o fuentes vegetales puesto que estos permiten altos títulos de cultivo celular y de secreción de productos, a diferencia del uso de suero en procesos a gran escala.³⁵ La etapa de cultivo es una de las operaciones clave dentro de la producción de proteínas recombinantes, ya que afecta el rendimiento y la calidad del producto (por ejemplo, el perfil de glicosilación del producto).³⁷

El procedimiento común de recolección para el cultivo celular de mAb emplea la centrifugación seguida de filtros de profundidad (lecho fibroso donde las partículas pueden ser atrapadas en la superficie, pero también en el grueso del medio filtrante) y de membrana (atrapan partículas en la superficie mediante intercepción directa, es decir, impiden el paso de las partículas), esto previo a las filtraciones realizadas en la producción en sentido “agua abajo” o “downstream” con el fin de eliminar las células y los residuos celulares, siendo el filtro de profundidad por su elevada retención de contaminantes el más conveniente para adsorber las impurezas solubles, como las proteínas de la célula huésped y el ADN.⁴¹

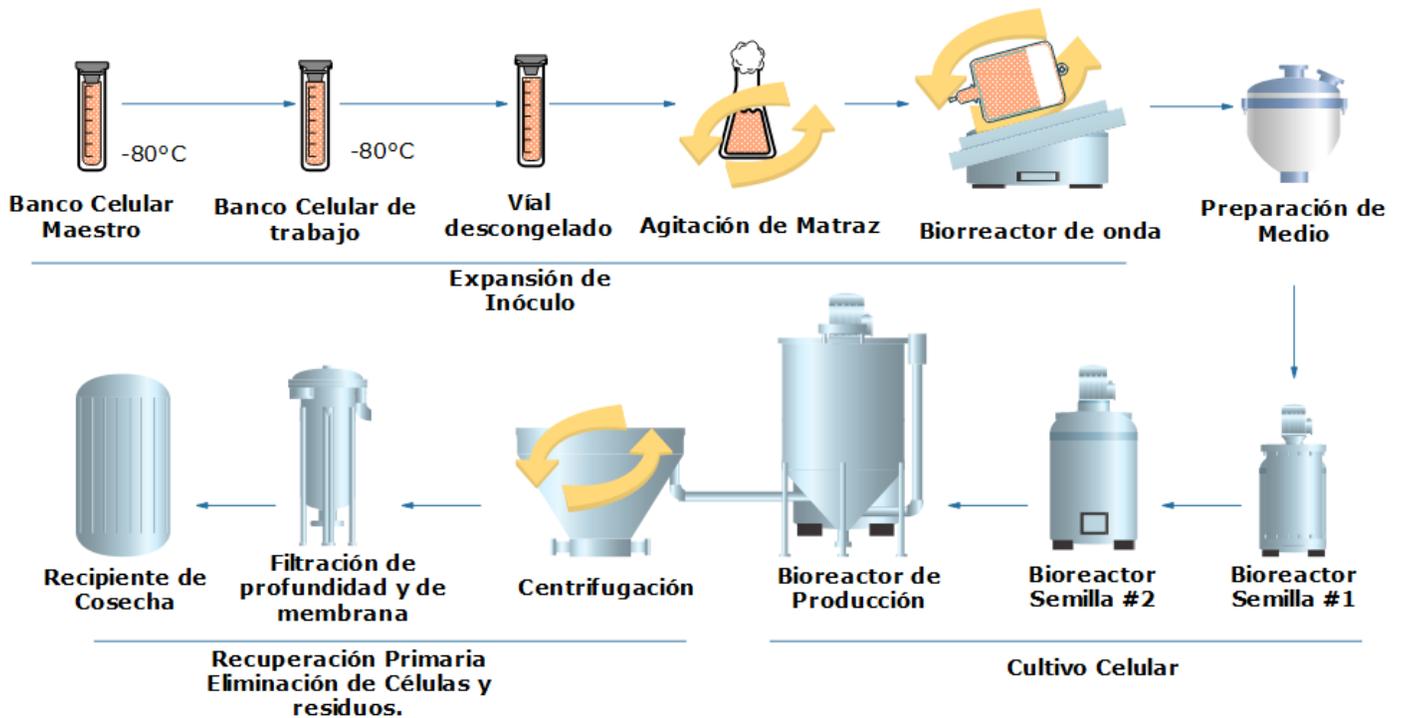


Ilustración 1 Proceso de Producción "agua arriba" o "upstream" adoptado en compañías biotecnológicas para el proceso fabricación de mAb. ¹

El proceso de fabricación biotecnológica continúa en sentido "agua abajo" o "downstream" donde la purificación de la proteína recombinante y la eliminación de impurezas tienen lugar. Se recolecta el producto del caldo celular obtenido, se concentra y se lleva a cabo la separación de las impurezas (como lo son células, residuos celulares, ADN, y la mayoría de las proteínas). En la Ilustración 2 se muestra un diagrama para un proceso de producción en sentido "agua abajo" o "downstream" que se utiliza a menudo para la producción de mAb.¹

La separación de impurezas se basa en el uso de la cromatografía de afinidad donde el ligando de la Proteína A se une de manera específica a la región del fragmento cristalizable (Fc) de los mAb. En un solo paso esta técnica proporciona una pureza > 98%, así las proteínas de la célula huésped, el ADN y otras impurezas del proceso de cultivo celular fluyen

mientras el producto se une a la fase estacionaria, después los mAb se obtienen a través de elución en condiciones de pH bajo, la posterior etapa de "pulido" permite alcanzar niveles aceptables de pureza farmacológica, reduciendo impurezas relacionadas con el producto como proteínas de la célula huésped, el ADN y los agregados de alto peso molecular, a continuación se da paso al aclaramiento viral, en el cual se efectúa la inactivación viral y la eliminación viral basada en la filtración, siendo el último paso la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) con el fin de reducir los volúmenes de almacenamiento para así intercambiar el producto en el tampón de formulación y obtener la sustancia farmacéutica.⁷

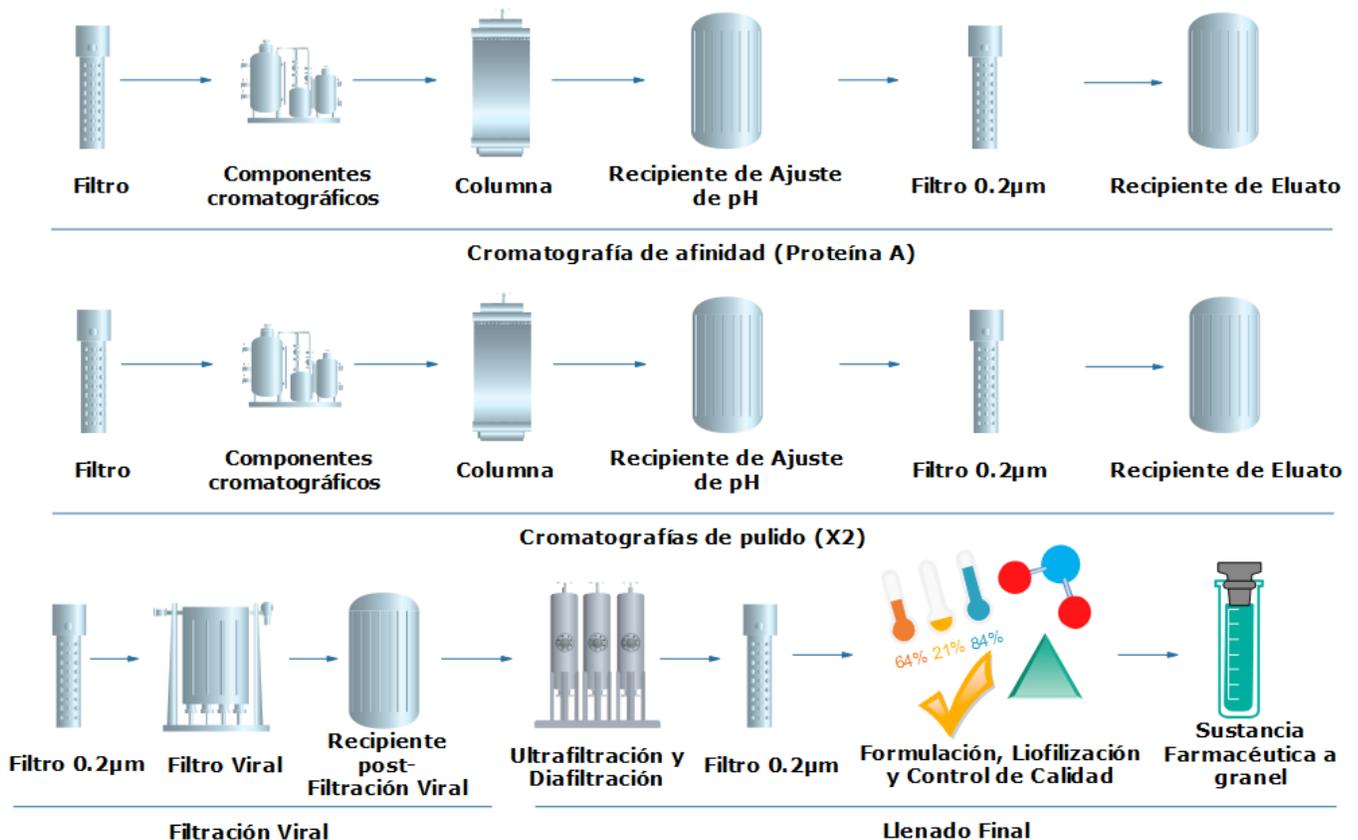


Ilustración 2 Proceso de Producción "agua abajo" o "downstream" que se utiliza a menudo para la producción de mAb.^{1,2}

La mayoría de los mAb se encuentran formulados en líquido o en polvo liofilizado envasado con líquido para dilución, sin embargo, cabe destacar que los mAb son más estables en una formulación liofilizada (donde es eliminada el agua por congelamiento del producto húmedo y la posterior sublimación de esta en condiciones de vacío) que en la forma líquida, puesto que la naturaleza proteica de los mAb, su estabilidad es afectada durante el almacenamiento a largo plazo.⁴⁰

III. Contaminantes comunes

El desarrollo de un proceso de fabricación para un mAb requiere la consideración de numerosos factores diferentes, incluida la eliminación de impurezas, si bien el proceso de fabricación cuenta con etapas de purificación y pulido, hay un riesgo intrínseco de contaminantes en el producto.

El rechazo de lotes de productos biotecnológicos, durante la producción, generalmente se deben a la contaminación por agentes biológicos, tal como los microorganismos o subproductos producidos por estos o por los sistemas de expresión utilizados, incluidas las toxinas o los pirógenos.²⁶

Al ser los productos biotecnológicos aislados de sustancias proteínicas, las impurezas más comunes en estos son proteínas residuales de la célula hospedera, agregados de alto peso molecular, ADN y virus. Estas impurezas pueden causar reacciones alérgicas o hacer que los efectos terapéuticos del medicamento sean diferentes a los previstos y provocar una respuesta inmune adversa.

Por otra parte, la contaminación bacteriana se encuentra latente durante todo el proceso, por ejemplo, durante la fase de cultivo donde se utilizan componentes que promueven el crecimiento, esta se produce con tanta frecuencia en la fabricación de productos de cultivos celulares tradicionales como en la fabricación de productos de cultivos

recombinantes.¹² Así, de llegar a existir contaminación bacteriana puede resultar en altos niveles de endotoxinas que se co-purificarían con la proteína a granel. Este tipo de impurezas son una causa potencial de reacciones pirogénicas en medicamentos parenterales puesto que actúan como un inmunoestimulante fuerte que activa el sistema del complemento, un peligro grave para la salud llegando en algunos casos a ser fatal para el paciente.²⁵

La presencia de contaminantes microbiológicos en los medicamentos no solo los hace peligrosos desde el punto de vista infeccioso, sino que también puede cambiar las propiedades físicas, químicas y organolépticas de los medicamentos, alterar el contenido de los principales ingredientes activos o convertirlos en productos tóxicos.³⁰

Por lo anterior la contaminación microbiológica de los productos biotecnológicos además de representar un gran peligro por los componentes bacterianos secretados en el biofármaco, como las endotoxinas, potencialmente puede llegar a causar el deterioro de la proteína a consecuencia de la metabolización realizada por estos microorganismos contaminantes. A continuación se señalan posibles escenarios perjudiciales respecto a la contaminación microbiológica en la producción de anticuerpos monoclonales:^{32,36}

- Degradación del principio activo, mAb, llevada a cabo por las enzimas producidas por contaminantes microbianos reduciendo la dosis, alterando su identidad y reduciendo su eficacia que, por lo tanto, trae consigo una disminución en la potencia biotecnológica, también puede verse reflejado en la alteración de las estructuras más susceptibles de los mAb, particularmente en las regiones hipervariables (HVR), con ello los productos degradados además de poder manifestar una actividad reducida, podrían mostrar un

aumento de la inmunogenicidad, representando un peligro potencial para la salud de los pacientes.^{40,13}

- En el caso de contaminación por micoplasma, como *Mycoplasma Arginini* o *Mycoplasma orale*, existe un rendimiento reducido del mAb, en otros casos el mAb producido resulta ser para micoplasma en lugar de antígeno objetivo.
- En el caso de contaminación por virus, como el parvovirus, puede resultar en un evento catastrófico como la muerte del cultivo celular.

Consecuentemente, en vista que los mAb están reservados a tratamiento de enfermedades como el cáncer y son administrados generalmente por vía intravenosa es crítico el control de la carga biológica en todo el proceso de fabricación, a través de la validación del PA para minimizar el riesgo de contaminación de los medicamentos y garantizar la esterilidad del producto biotecnológico.

10. Validación del Procesamiento Aséptico

I. Fuentes de Contaminación Comunes

En el proceso de fabricación de mAb, existe un riesgo de contaminación latente en cada operación, no sólo en la etapa de llenado final, puesto que las condiciones del proceso son favorables para el crecimiento microbiano (por ejemplo, disponibilidad de agua, pH, temperatura, contenido de carbono). Gracias a la alta tasa de crecimiento bacteriano, que incluso puede llegar a superar y destruir las células animales que tienen una tasa de crecimiento menor, la contaminación en etapas intermedias puede llevar a las siguientes consecuencias significativas para el proceso:

- Alteraciones en los perfiles de impurezas (más allá del último paso de eliminación de estas) propiciadas por los subproductos microbianos (endotoxinas, ADN, flagelos y exotoxinas).
- Lotes fallidos, es decir, el rechazo del producto final.
- Problemas de seguridad potencialmente significativos por pérdida de tiempo y dinero invertidos en la investigación y en la fabricación.

Por lo anterior, además de comprender las operaciones unitarias del proceso de fabricación de mAb y los puntos críticos de control de este, es indispensable que las biotecnológicas cuenten con un amplio soporte de conocimiento sobre los contaminantes más frecuentes en un bioproceso y las fuentes más comunes de contaminación, esto a través de la gestión de riesgos de la calidad del proceso, precedente a la validación, a fin de lograr el adecuado monitoreo y control de las condiciones asépticas.

Los contaminantes bacterianos asociados a la contaminación de los bioprocesos incluyen bacterias, hongos, levaduras, mohos y contaminación por virus, como se muestra en la Tabla 1

“Contaminantes microbianos comunes en procesos biotecnológicos.”¹⁹

En la mayoría de los entornos líquidos, los microorganismos existen como biopelículas (comunidades multicelulares unidas por una matriz extracelular autoproducida) y la erradicación completa de esta es muy difícil.⁵

CONTAMINANTES MICROBIANOS COMUNES EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS.		
Contaminante	Ejemplos de Contaminantes típicos	Fuente primaria
Cocos Gram (+)	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Micrococcus</i>	Humana
Bacilos Gram (+)	<i>Corynebacterium, Actinomyces, Arthrobacte</i>	Suelo
Bacilos Gram (-) Formadores de esporas	<i>Bacillus, Clostridium (anaerobio)</i>	Suelo, polvo, vegetación
Bacilos Gram (-)	<i>Pseudomonas, Ralstonia, Burkholderia, Acenitobacter Stenotrophomonas, Serratia, Klebsiella</i>	Agua Suelo, agua y vegetación
Levaduras	<i>Candida, Rhodotorula, Cryptococcus</i>	Humana, suelo, vegetación
Moho	<i>Aspergillus, Penicillium, Alternaria, Fusarium, Cladosporium</i>	Polvo, suelo, vegetación

Micoplasmas	<p><i>Mycoplasma hyorhinis</i> (porcinos),</p> <p><i>Mycoplasma arginini</i> (bovinos),</p> <p><i>Mycoplasma orale</i> (humanos; el contaminante más común),</p> <p><i>Acholeplasma laidlawii</i> (medio ambiente)</p>	Materiales y reactivos de origen animal, líneas celulares, personal de laboratorio, instalaciones
Virus	Bacteriófago (contaminante de líneas celulares bacterianas), Parvovirus (virus de ratones diminutos), Retrovirus (X-MuLV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	Materiales y reactivos de origen animal, líneas celulares

Tabla 1 Contaminantes microbianos comunes en procesos biotecnológicos.¹⁹

Existen múltiples maneras para que estos microorganismos se introduzcan dentro del bioproceso. En general, las principales fuentes de contaminación microbiana son: materiales, instalaciones, servicios públicos, personal, procesos y equipos.¹⁹ En la Ilustración 3 se muestran “Factores principales que influyen en el riesgo de contaminación microbiológica de los productos biotecnológicos.”²⁰

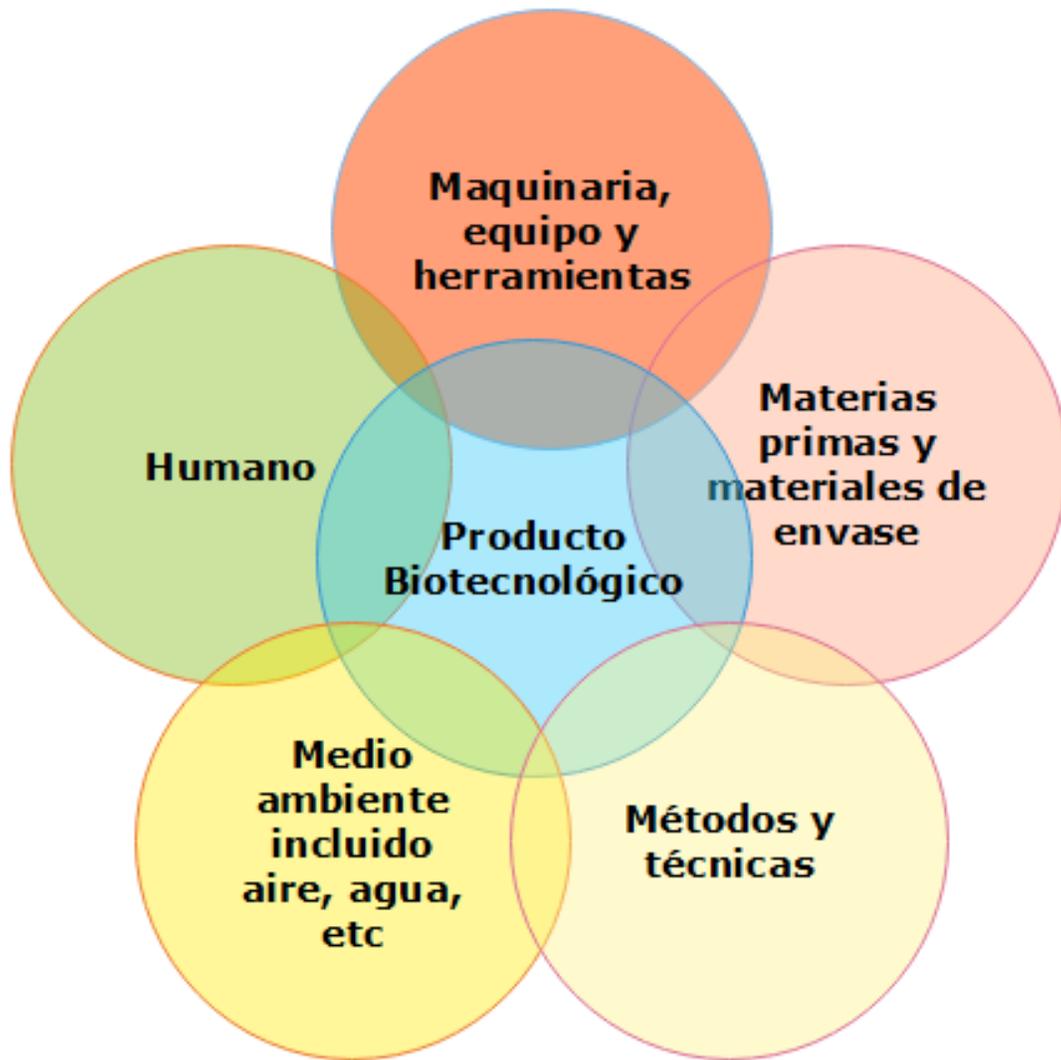


Ilustración 3 Factores principales que influyen en el riesgo de contaminación microbiológica de los productos biotecnológicos.²⁰

Con el fin de prevenir o reducir el riesgo de contaminación por las fuentes más comunes antes mencionadas, a continuación, se enlistarán los requerimientos en las operaciones unitarias clave para el PA de los bioprocesos.³⁹

II. Operaciones unitarias implicadas en el PA

En vista de que no existe un proceso para esterilizar el producto en su envase final, la fabricación aséptica de medicamentos biotecnológicos se compone de numerosos segmentos individuales que en conjunto mitigan la posibilidad de contaminación hacia el ambiente crítico o al producto.

El PA involucra más variables que la esterilización terminal, por ejemplo, el material de vidrio es sometido a esterilización/despirogenado por calor seco; los tapones de goma son sometidos a esterilización por calor húmedo; mientras que las formas farmacéuticas líquidas, en este caso los mAb, se someten a esterilización por filtración y es fundamental que los envases se llenen y sellen en un ambiente controlado, de acuerdo con el Apéndice Normativo A de la NOM-059 vigente. Todas las variables representan un riesgo de contaminación microbiana y como se ha mencionado anteriormente, podría resultar en la distribución de un producto no estéril, por ello, las operaciones unitarias en torno a este requieren de un control cuidadoso y es necesario que sean validadas de manera precedente a iniciar el PA.^{10,31,39}

Los requisitos de validación apropiados para una instalación de PA tienen como objetivo primordial: la provisión de personal operativo calificado, principalmente, en las técnicas de trabajo en condiciones asépticas, con el equipo y ropa convenientes, así como un medio ambiente con aire controlado, por lo que respecta a partículas viables y totales, temperatura y humedad relativa, diseñado debidamente y que permita, además, el mantenimiento eficaz de las unidades de suministro de aire.³⁹

La importancia y los aspectos básicos por considerar en la validación de cada uno de los múltiples elementos que integra el PA se muestra a continuación:

a. Áreas

Estas incluyen los acabados sanitarios, las condiciones ambientales "as-built", estática y dinámica de la misma, los materiales de construcción, los recubrimientos, la colocación de la maquinaria dentro del área, sus materiales de construcción, las instalaciones, los servicios, etc. ³¹

La NOM-059-SSA1-2015 (sección 8.2.2 "Áreas de producción"), la Organización Mundial de la Salud (OMS) ("GMP for Biological Products Guideline") y La FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice") puntualizan los criterios básicos a considerar para las áreas de producción, entre ellos cabe destacar los siguientes:

- El tamaño y número de áreas deberá ser acorde a la capacidad de fabricación, equipos, diversidad de productos y tipo de actividades para cada una de las áreas, además contemplar cuartos para el acceso y salida del personal y cambio de ropa de acuerdo a su clasificación.
- Contar con tuberías identificadas, de acuerdo al código de la NOM-026-STPS-2008, tuberías que transfieran materias primas, productos intermedios o a granel, deben ser de un material inerte no contaminante, por ejemplo Acero Inoxidable 316 y 304, y estar identificadas, mientras que los drenajes deben contar con trampas a fin de prevenir contraflujo o contaminación.
- Se debe contar con áreas para el almacenamiento de los accesorios de los equipos de fabricación, herramientas, sustancias o materiales requeridos para el mantenimiento de los equipos de fabricación cumpliendo con las condiciones sanitarias de acuerdo al área donde se encuentren.

- Las áreas de producción deben tener acabado sanitario, es decir terminación de superficies interiores de las áreas con la finalidad de evitar la acumulación de partículas viables y no viables y facilitar su limpieza, todos los servicios deben ser diseñados e instalados para evitar acumulación de polvos y facilitar su limpieza, su ubicación debe evitar flujos cruzados, minimizando el riesgo de contaminación al producto.
- Las áreas de producción, muestreo, pesadas, envasado primario y todas aquéllas donde se encuentren expuestos componentes, productos y sus servicios inherentes (particularmente los sistemas de aire) en la fabricación de biofármacos deben ser completamente independientes y autocontenidas. Áreas donde se generen polvos deben contar con sistemas de extracción y colección de polvos.
- Las operaciones críticas para la fabricación de estériles como la preparación de materiales, procesos de esterilización, despirogenado y llenado, deben realizarse en áreas controladas y separadas físicamente, el pesado y muestreo de fármacos estériles podrá realizarse también en una zona específica del área de producción.
- En las áreas asépticas, los techos falsos deben ser sellados para prevenir contaminación proveniente del espacio encima de ellos y en las áreas Clase A y Clase B, usadas para producción aséptica, están prohibidos los drenajes.
- A pesar de que las áreas tengan que ser separadas para cada uno de los procesos de fabricación, los procesos de formulación y llenado de biotecnológicos podrán efectuarse en áreas de fabricación comunes de productos estériles previa autorización de la COFEPRIS.

- Se debe asegurar especialmente la contención en áreas donde se manejen productos que contengan agentes patógenos, de alta toxicidad, virus o bacterias vivas, se deben utilizar sistemas de ventilación dedicados sin posibilidad de recirculación con áreas adyacentes donde no se manejan organismos patógenos viables, con el propósito de evitar la liberación de éstos al medio ambiente.
- Se debe contar con un sistema de alarma para indicar cualquier falla en el sistema de aire, indicadores de presión diferencial y la diferencial de presiones debe ser registrada, además se debe demostrar que el patrón de flujo de aire no representa un riesgo de contaminación.
- Se debe contar con un sistema de "interlock" y un sistema de alarma visual y/o auditivo para evitar que dos puertas consecutivas sean abiertas simultáneamente.
- Los vestidores para ingreso a áreas de PA deben diseñarse como esclusas de aire y proporcionar separación física de las diferentes etapas de cambio. La etapa final de los vestidores, en condiciones estáticas, debe cumplir con la misma clasificación del área a la que conduce. Estos deben ser separados para entrada y salida del personal.
- Las operaciones de acondicionamiento deben realizarse en un área específica, diseñada y localizada de forma tal que el flujo de personal, insumos y producto en proceso evite contaminación, confusión y mezcla de productos e insumos.

Se deberá contar con un sistema de monitoreo de las variables críticas de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) a fin de cumplir con la clasificación del Apéndice Normativo A de la NOM-059.

- El PA además de requerir pisos, paredes y techos de superficies lisas y duras que se puedan limpiar fácilmente, también requiere; controles de temperatura y humedad; un suministro de aire filtrado a través de filtros de aire de alta eficiencia de partículas, bajo presión positiva, independientemente de si el flujo es unidireccional o no; un sistema de monitoreo de condiciones ambientales; un sistema para limpiar y desinfectar la sala y el equipo para producir condiciones asépticas; un sistema de mantenimiento para cualquier maquinaria y/o equipo usado en el control de las condiciones asépticas.

b. Sistemas críticos

i. Sistema de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC).

El ambiente deseado en una instalación de PA se puede lograr gracias al alto nivel de tecnología de filtración de aire, lo que contribuye a la calidad microbiológica y cantidad de partículas requerida. Las instalaciones incluyen sistemas de barreras primarias (en las cercanías del artículo expuesto) y secundarias en las que se lleva a cabo el PA. Además de contemplar las características mencionadas en la sección de "áreas", se deben considerar donde sea necesario dispositivos tales como esclusas de aire y duchas de aire, diferenciales de presión adecuadas entre salas con mayor presión positiva en los cuartos y zonas de PA, empleo de flujo de aire unidireccional en las zonas en las que el producto o cualquiera de sus componentes se expongan al ambiente. El Sistema de Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado (HVAC) tiene la función de contribuir al aseguramiento de calidad y pureza del producto, así como favorecer las actividades del personal que las lleva a cabo, este debe ser diseñado, construido y mantenido de acuerdo con la FEUM con el fin de asegurar la clasificación requerida en el Apéndice A Normativo de la NOM-059-SSA1-

2015³¹, tomando en consideración al menos los siguientes parámetros: temperatura, humedad relativa de las áreas que alimenta, volumen de inyección de aire, diferenciales de presión entre las áreas, número de cambios de aire por hora, conteo de partículas, flujos de aire, niveles de limpieza, velocidad de flujo y pruebas de integridad de los filtros Atrapadores de Partículas de Alta Eficiencia (HEPA).²¹

Los contaminantes principales en el aire ambiental son clasificados en partículas viables o microorganismos y partículas totales, presencia de vapor de agua o de otras sustancias extrañas.

El Aire de proceso se va a clasificar, principalmente, de acuerdo con el grado de limpieza que tenga, y se mide con el contenido de partículas totales por unidad de volumen y partículas viables por unidad de volumen o por placa.³¹

La pureza del aire estará en relación directamente con la exposición al ambiente del producto y sus componentes antes de su envasado primario, requiriendo un tipo de área de proceso particular. Los diferentes tipos de clase se describen a continuación:³⁸

- "Clase A" o "ISO Clase 5" utilizada en llenado y operaciones asépticas, muestreo, pesado y surtido de insumos estériles. Esta cuenta con monitoreo continuo de partículas totales y partículas viables durante todo el proceso de llenado, Presión diferencial $\geq 15\text{Pa}$ con respecto a cuartos adyacentes, aplicando un concepto de cascada, temperatura de 18 °C a 25 °C y humedad relativa del 30-65%.
- "Clase B" utilizada como entorno de Clase A para productos estériles que no llevan esterilización terminal, esclusas a cuartos de llenado y cuartos de vestidores para áreas Clase A. Esta cuenta con monitoreo cada 3 meses de partículas totales y diario o por turno de producción para partículas viables, presión diferencial $\geq 15\text{Pa}$ con

respecto a áreas no asépticas, aplicando un concepto de cascada, temperatura de 18 °C a 25 °C y humedad relativa del 30-65%.

- “Clase C” utilizada en el llenado de productos con esterilización terminal, Preparación de soluciones para filtración esterilizante, para esterilización terminal, elementos del sistema de contenedor-cierre y Almacenamiento de accesorios para formas farmacéuticas estériles. Esta cuenta con monitoreo cada 6 meses de partículas totales (a excepción de llenado de soluciones con esterilización terminal que se realice c/3 meses) y semanalmente para partículas viables, Presión diferencial $\geq 10\text{Pa}$, temperatura de 18 °C a 25 °C y humedad relativa del 30-65%.
- “Clase D” utilizada como entorno de Clase C, Cuartos de aisladores, Cuartos incubadores y de refrigeración (localizadas en áreas de producción), Preparación y envasado primario de formas farmacéuticas no estériles, Muestreo, pesado y surtido de insumos no estériles. Esta cuenta con monitoreo cada 6 meses de partículas totales y mensualmente para partículas viables, Presión diferencial $\geq 5\text{Pa}$ Presión negativa donde se generan polvos con respecto a los cuartos adyacentes y positiva con respecto a donde no se generan polvos, temperatura de 18 °C a 25 °C y humedad relativa del 30-65%.
- “ISO Clase 9” utilizada Acondicionamiento Secundario. Esta cuenta con monitoreo anual de partículas totales y partículas viables, Presión diferencial positiva con respecto a áreas no clasificadas, temperatura de 18 °C a 25 °C.

Antes de ser esterilizados, los productos, materiales, recipientes, componentes, pueden manipularse o procesarse en un ambiente de sala limpia más bajo, por ejemplo, la manipulación de componentes después del lavado puede realizarse en área grado D y la preparación de soluciones

a filtrar en área grado C, después de las etapas de esterilización todas las operaciones de PA, es decir, manejo y llenado de preparaciones asépticas deberán realizarse en un área Clase A, rodeada de un ambiente Clase B. En el caso de las áreas Clase A, B y C deben contar como mínimo con filtros terminales HEPA de 99.97% de eficiencia para partículas de tamaño de 0.3 μm . En el caso de Clase D deben contar como mínimo con filtros de eficiencia de 95% y para clase ISO 9 deben contar como mínimo con filtros de eficiencia de 85%.

La FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice") proporciona aspectos básicos a considerar entorno a los filtros HEPA que a continuación se mencionan:

- La integridad del filtro HEPA debe mantenerse para garantizar condiciones asépticas.
- Las pruebas de fugas deben realizarse en la instalación para detectar brechas de integridad alrededor de las juntas de sellado, a través de los marcos o a través de varios puntos del filtro.
- Las pruebas de fugas para los filtros HEPA deben realizarse en intervalos de tiempo establecidos en las instalaciones de PA. Por ejemplo, dichas pruebas deben realizarse dos veces al año para la sala de PA, o cuando se realicen cambios que afecten a los filtros directa o indirectamente.
- Cuando se considere que la calidad del aire es inaceptable, es decir se encuentre fuera de especificaciones, o como parte de una investigación sobre el llenado de los medios o la falla de esterilidad del producto farmacéutico, se pueden realizar pruebas adicionales.

- Los filtros instalados en túneles de despirogenado por calor seco y hornos, comúnmente utilizados para despirogenar viales de vidrio, deben probarse para detectar fugas.

ii. Agua, Aire Comprimido, Nitrógeno.

Otros sistemas críticos involucrados en el PA son, por ejemplo: agua, aire comprimido, nitrógeno.

El sistema de generación y distribución de agua para uso farmacéutico debe ser diseñado, construido y mantenido para asegurar la calidad del agua, de acuerdo con la FEUM. El agua es la sustancia más utilizada en la industria farmacéutica, ya sea como disolvente o ingrediente para los preparados farmacéuticos, en el lavado de envases o en las operaciones de limpieza de áreas y equipos durante los procesos de fabricación.

Existen diferentes tipos de agua para uso farmacéutico cada uno es definido por la FEUM (en su capítulo dedicado a sistemas críticos) y la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 41-NF 36), estos se describen a continuación:

- El Agua potable es la fuente de agua prescrita para la producción de agua para uso farmacéutico, esta puede emplearse en las etapas iniciales de la síntesis química de las sustancias activas farmacéuticas, así como en la limpieza de los equipos empleados para su producción.
- Agua purificada se emplea como excipiente en la producción de preparaciones no parenterales y en otras aplicaciones farmacéuticas, como por ejemplo la limpieza de determinados equipos y componentes que entran en contacto con el producto no parenteral. Debe cumplir con los requisitos de pureza química, iónica y orgánica, y debe protegerse de la contaminación microbiana. La calidad mínima del agua fuente, o agua de

alimentación para la producción de Agua purificada es la del Agua potable, la cual puede purificarse usando operaciones unitarias que incluyen la desionización, la destilación, el intercambio iónico, la ósmosis inversa, la filtración u otros procedimientos de purificación adecuados.

- Agua para la fabricación de inyectables. Se usa como vehículo o disolvente en la fabricación de productos farmacéuticos inyectables, fabricación de principios activos de uso parenteral, así como en los últimos pasos de la limpieza de equipos, tuberías y recipientes involucrados en estos procesos. Esta es preparada a partir de Agua potable a la que se le dan los tratamientos adecuados seguidos de un proceso terminal de destilación u otra tecnología equivalente o superior que demuestre la eliminación de sustancias químicas, microorganismos y endotoxinas y que no contiene sustancias adicionadas. También es posible tener como punto de partida el agua purificada, sometiéndola a un proceso de destilación. El sistema usado para la producción, almacenamiento y dispensado o distribución de Agua para la fabricación de inyectables debe estar diseñado para prevenir la contaminación microbiana, la formación de endotoxinas bacterianas y debe estar validado.

Cada uno de los tipos de agua debe cumplir con las especificaciones establecidas en la monografía respectiva de la FEUM. Los sistemas de purificación, circulación y almacenamiento del agua purificada deben considerar elementos protectores que eviten la proliferación microbiana, así como un programa frecuente de sanitización y monitoreo microbiológico que garantice la adecuada calidad microbiológica en los puntos de uso.

El Agua potable debe cumplir con los requisitos de la versión vigente de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, donde el monitoreo

sistemático de la calidad contempla llevar a cabo las siguientes pruebas esenciales:

- Las propiedades organolépticas (color, olor y sabor).
- Turbiedad.
- Cloro residual libre.
- Dureza total.
- pH.
- Organismos coliformes totales.
- ***Escherichia coli*** o coliformes fecales u organismos termo tolerantes.
- De manera complementaria se recomienda la prueba: Sílice.

Debe tenerse precaución durante el manejo y almacenamiento del agua para evitar la contaminación y/o el crecimiento de la carga microbiana y establecer y registrar los tiempos límites de almacenamiento del agua para producción de productos estériles. El control de la calidad microbiológica de cualquier tipo de agua es crucial dada la ubicua presencia de los microorganismos y la facilidad y rapidez con la que se reproducen, ya que los microorganismos o sus productos metabólicos en el agua, como se ha abordado anteriormente, podrían llegar a causar efectos adversos en los seres humanos.³¹

Por otro lado, los gases comprimidos, como el aire, el nitrógeno y el dióxido de carbono, se utilizan a menudo en salas limpias y con frecuencia se emplean para purgar. Estos deben contar con la pureza apropiada (por ejemplo, libre de petróleo) y en cuanto a su calidad microbiológica y de partículas después de la filtración debe ser igual o mejor que la del aire en el ambiente en el que se introducen. Los filtros de membrana

hidrofóbicos producen un gas comprimido estéril que se puede emplear en operaciones que involucran materiales estériles, como componentes y equipos. Un ejemplo de ello es el uso de filtros de membrana estériles para líneas de aire de autoclave, ingreso de aire para roturas de vacío en el liofilizador y tanques que contengan materiales esterilizados.¹⁰

La NOM-059-SSA1-2015 (sección 10.4 "Sistemas de producción de productos estériles.") FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice") proporcionan aspectos básicos a considerar para los gases, que a continuación se mencionan:

- Cualquier gas que se utilice para purgar una solución o desplazar el aire del producto, se debe pasar a través de un filtro hidrofóbico de esterilización.²¹
- Los filtros de gas (incluidos los filtros de ventilación) deben estar secos. La condensación en un filtro de gas puede causar un bloqueo durante el uso o permitir el crecimiento de microorganismos. Es importante considerar el uso de filtros hidrófobos, así como la aplicación de calor a estos filtros cuando sea apropiado, y así prevenir residuos de humedad.
- Los filtros que sirven como límites estériles o que suministran gases estériles, que pueden afectar la integridad del producto, se deben probar durante la instalación y de manera periódica (por ejemplo, al final del uso).
- Se recomienda la realización de la prueba de integridad después de actividades que pueden dañar los filtros.
- Las fallas de la prueba de integridad deben investigarse y los filtros deben reemplazarse a intervalos apropiados y definidos.

- Los tanques de retención esterilizados y cualquier líquido contenido deben mantenerse bajo presión positiva o sellados adecuadamente para evitar la contaminación microbiana. Deben establecerse medidas de seguridad para evitar un cambio de presión que pueda resultar en contaminación debido al reflujó de aire o líquido no estéril.
- Los filtros HEPA deben reemplazarse cuando se detecta una falta de uniformidad de la velocidad del aire en un área del filtro o los patrones de flujo de aire son afectados negativamente.

c. Esterilización del producto y demás componentes

La esterilización del producto y demás componentes, incluyendo el envase primario, son procesos que deben validarse.

Como se ha abordado anteriormente un medicamento biotecnológico producido por PA puede estar contaminado por el uso de uno o más componentes que se encuentren contaminados con microorganismos o endotoxinas, se debe garantizar previamente el cumplimiento de especificaciones de los materiales de partida y empaque determinados para el bioproceso así como realizar la calificación de proveedores la cual debe ser concluida antes de la validación del proceso, aunado a esto si la esterilización es llevada a cabo por terceros, la responsabilidad de la validación es del fabricante del producto, así como la conservación de la esterilidad durante el transporte de las instalaciones del tercero hasta el ingreso al ambiente crítico del fabricante.³¹

Como ejemplos de los componentes en el Producto Biotecnológico tenemos a los ingredientes activos, es decir, el biofármaco, el agua para la fabricación de inyectables (WFI) y otros excipientes que se utilizan dentro de la formulación, por ello es importante caracterizar el contenido microbiano (carga biológica, endotoxinas) de cada componente que podría estar contaminado y establecer límites de aceptación apropiados.

El conocimiento de la carga biológica es importante para evaluar si un proceso de esterilización es adecuado.

A continuación, se presentan los procesos de esterilización más comunes en la fabricación de productos biotecnológicos.¹⁰

- La filtración de una solución a partir de la disolución de el (los) componente (s) en agua para la fabricación de inyectables es un método ampliamente utilizado para productos biotecnológicos, como los mAb que son afectados adversamente por el calor, estos, se hacen pasar a través de una membrana esterilizante.
- Una variación del método anterior incluye someter la solución filtrada a cristalización aséptica y precipitación (o liofilización) del componente como un polvo estéril. Sin embargo, este método implica más pasos, por lo tanto, tiene un mayor potencial de contaminación durante el procesamiento.

La NOM-059-SSA1-2015 (sección 10.4 "Sistemas de producción de productos estériles.") FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice") enlistan aspectos básicos a considerar para los componentes, a continuación se mencionan:

- Debe haber procedimientos escritos y especificaciones apropiadas para la aceptación o el rechazo de cada lote de componentes que puedan contener endotoxinas. Cualquier componente que no cumpla con los límites de endotoxinas definidos debe ser rechazado.
- Deben existir procedimientos escritos que describan con suficiente detalle la recepción, identificación, almacenamiento, manejo, muestreo, análisis y aprobación o rechazo de componentes y recipientes y cierres de productos farmacéuticos, los cuales deberán seguirse.

- Los componentes, los contenedores y cierres de productos farmacéuticos se deben manipular y almacenar en todo momento de una manera para prevenir la contaminación.
- Las operaciones de carga y descarga para la esterilización y despirogenado de insumos y materiales debe realizarse en un ambiente que asegure su condición de esterilidad y evite confusiones.
- Se deben establecer, validar y registrar los tiempos límites entre la esterilización y la utilización de los materiales.
- Todas las soluciones, en particular fluidos de perfusión, de gran volumen, se debe pasar a través de un filtro de retención de microorganismos, si es posible situado inmediatamente antes del llenado.²¹

d. Integridad del sistema contenedor-cierre.

Se conoce como "sistema contenedor-cierre", al conjunto de materiales de empaque que contienen y protegen a la forma farmacéutica. Incluye tanto al envase primario como al secundario, si este último cumple la función de proporcionar protección adicional de la esterilidad del producto.

La NOM-059-SSA1-2015 y FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice") establecen criterios básicos a considerar para este sistema, a continuación se mencionan:

- Se deben realizar pruebas de integridad al producto en su sistema contenedor-cierre.
- El manejo y llenado de preparaciones asépticas, cuando el sistema contenedor-cierre no esté herméticamente cerrado, debe realizarse en Clase A.

- Los contenedores cerrados por fusión, por ejemplo, ampollitas de vidrio o plástico, deben inspeccionarse en su integridad al cien por ciento. Para otro tipo de contenedores se deben verificar muestras mediante procedimiento farmacopeico.
- El sistema contenedor/cierre debe estar validado, a fin de garantizar la integridad y esterilidad del producto.²¹
- Para los medicamentos parenterales, como los medicamentos biotecnológicos, los recipientes y cierres deben ser estériles y apirogénicos. El proceso utilizado para lograrlo dependerá principalmente de la naturaleza del contenedor y/o los materiales de cierre. La validación para este proceso debe demostrar su capacidad para esterilizar y despirogenar estos materiales; los tiempos de retención de contenedores y cierres despirogenados estériles también deben estar validados.¹⁰
- La preparación previa a la esterilización de los recipientes de vidrio abiertos generalmente implica una serie de ciclos de lavado y enjuague. En esta preparación se recomienda el uso de agua purificada con el fin de no contaminar los recipientes para productos parenterales. El agua de enjuague final debe cumplir con las especificaciones de "agua para la fabricación de inyectables". Para su esterilización los recipientes de vidrio son sometidos generalmente a calor seco logrando tanto la esterilización como el despirogenado, mientras que los recipientes de plástico pueden esterilizarse con un gas apropiado, radiación u otros medios adecuados, los cuales deberán estar validados.
- Los cierres de caucho (por ejemplo, tapones y émbolos de jeringa) se pueden limpiar mediante múltiples ciclos de lavado y enjuague antes de la esterilización por vapor o irradiación final. El

despirogenado se puede lograr mediante múltiples enjuagues con “agua para la fabricación de inyectables” en caliente.

Con todo lo anterior es posible garantizar la integridad del sistema contenedor-cierre y la conservación de la esterilidad y apirogenicidad del producto.

e. Limpieza y esterilización de equipos

La NOM-059-SSA1-2015 establece que después de haberse realizado el proceso de inactivación de vacunas de origen DNA recombinante, toxoides y extractos bacterianos, podrán ser formulados y llenados en las mismas áreas y equipos de otros productos estériles, considerando la valoración del riesgo correspondiente, así como métodos de limpieza y descontaminación validados.

A través de la limpieza es posible conseguir una disminución de partículas totales a niveles establecidos y reducción de la carga microbiana en equipos usados en la fabricación de medicamentos biotecnológicos, esta se efectúa como preámbulo de la sanitización y, en su caso, de la esterilización de los equipos. A continuación, se enlistan aspectos básicos a considerar para la limpieza y esterilización de equipos, proporcionados por La NOM-059-SSA1-2015 y la OMS (“GMP for Biological Products Guideline”):

- El equipo de fabricación debe ser diseñado y localizado para cumplir con el uso propuesto, evitar riesgo de contaminación, permitir su desmontaje/montaje, limpieza, mantenimiento y esterilización, si aplica.
- Debe existir un procedimiento validado para la limpieza que incluya un programa, instrucciones y registros. Deben elegirse y utilizarse equipos y agentes de limpieza adecuados, acordes a la naturaleza de los productos, para que no actúen como una fuente de

contaminación ni pongan en riesgo la calidad del biotecnológico, es necesario asegurar que éste quedó libre de cualquier contaminante.²¹

- Deben contar con un programa para el uso de sanitizantes el cual debe incluir un agente esporicida.
- Cuando el método de limpieza incluya procesos de sanitización, esterilización y/o descontaminación, éstos deberán ser validados (tres aplicaciones consecutivas del procedimiento con resultados satisfactorios), utilizando métodos analíticos validados, para detectar trazas. La periodicidad de determinación de trazas debe establecerse con base en la valoración del riesgo, de contaminantes, detergentes y/o sanitizantes. Además, se deben evaluar e incluir en el reporte las posibles interacciones entre los diferentes agentes sanitizantes.
- La limpieza y/o esterilización de los accesorios de tanques de fermentación y cultivo que lo requieran debe hacerse siguiendo un proceso validado. La vigencia de la limpieza de los equipos de fabricación deberá establecerse con base en los resultados de la validación.
- También se deben validar los procedimientos de limpieza de las superficies que estén en contacto con el producto.
- De procesar varios productos en el mismo equipo, con el mismo procedimiento de limpieza, puede usarse un producto representativo para la validación o el criterio del "peor caso", determinado este con base en la gestión del riesgo.
- Los procedimientos de limpieza y sanitización de las áreas Clase A y B debe incluir un agente esporicida validado.

- Para garantizar la efectividad de la limpieza, sanitización y desinfección, incluyendo la eliminación de residuos de agentes usados se deberá contemplar previamente, durante la gestión de riesgos de la calidad, que los procesos biotecnológicos implican el manejo de medios y otros agentes que promueven el crecimiento bacteriano.³⁹
- Se deben tomar precauciones ambientales y de seguridad del personal durante los procesos de limpieza y sanitización, además, el uso de agentes de limpieza y sanitizantes no debe suponer un riesgo importante para el desempeño del equipo.
- Cuando se utilicen sistemas abiertos durante el procesamiento (por ejemplo, durante la adición de suplementos de crecimiento, medios, tampones, gases, y durante el muestreo y manipulaciones asépticas durante el manejo de células vivas, como en los productos biotecnológicos), se deben implementar medidas de control para evitar la contaminación, confusiones y contaminación cruzada. Deben considerarse flujos lógicos y unidireccionales de personal, materiales, procesos y el uso de sistemas de limpieza en sitio y esterilización en sitio, siempre que sea posible. El uso de sistemas cerrados para mejorar la asepsia y la contención debe considerarse cuando sea posible.
- En el cambio de campaña se debe llevar a cabo la descontaminación/esterilización intensiva, si es necesario, y limpieza del equipo (todos los equipos y accesorios utilizados durante la producción) y el área de fabricación.

f. Calificación de Personal

El elemento más importante para la seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos, y en este caso la exitosa validación del PA, es el personal, por ser una potencial fuente de contaminación para el producto. Este debe recibir inducción en BPF desde su contratación, así como el entrenamiento en las actividades que va a realizar y capacitación continua. La capacitación es particularmente relevante para la producción de mAb por riesgo de contaminación microbiana debido al manejo de microorganismos, medios de cultivo y organismos adventicios.³⁹

Se debe emprender el entrenamiento adecuado del personal en el manejo de técnicas asépticas, incluyendo el proceso de vestimenta para que, por ejemplo, los overoles, batas, guantes y otras protecciones para el cuerpo cubran sustancialmente todas las superficies de piel y mucosas expuestas. Es de suma importancia establecer medidas de control específicas para el personal, como lo son: ³¹

- Establecimiento de indumentaria y equipos de protección específicos
- Establecimiento de tiempos de permanencia en las áreas de PA.
- Capacitación, entrenamiento y calificación de todo el personal involucrado.

La NOM-059-SSA1-2015 (sección 10.5 “Biológicos y Biotecnológicos”), La FEUM (sección “Esterilización”) y la OMS (“GMP for Biological Products Guideline”) puntualizan los criterios básicos a considerar para el personal, a continuación se muestran puntos aplicables a la producción de mAb.

- Personal que trabaje en áreas donde se fabrican los productos biotecnológicos, incluyendo aquel personal que no participa directamente en la producción del medicamento, deberá recibir entrenamiento específico y, posteriormente, ser calificado con el

propósito de contar con evidencia documental que demuestre que es capaz de llevar a cabo sus funciones, es decir, en los procesos en los que interviene, en técnicas de higiene, microbiología, además de procedimientos de limpieza, desinfección y cualquier medida de seguridad específica.^{21,31}

- En cuanto al entrenamiento inicial del personal, se debe llevar a cabo una capacitación adecuada antes de permitir que el individuo ingrese al área de fabricación aséptica.^{21,31}
- Así, para las operaciones asépticas, la capacitación y entrenamiento del personal involucrado y supervisor, debe incluir:
 - Técnica aséptica, técnicas de vestido/desvestido (manipulación y movimientos dentro de las áreas limpias).
 - Operaciones específicas (intervenciones) en áreas limpias.
 - Entrenamiento básico en microbiología.
 - Procedimientos para el desempeño o comportamiento dentro de las áreas de fabricación y técnicas asépticas.
 - Funciones específicas a realizar tales como filtración, armado y desarmado de maquinaria y equipo, ajustes, reparaciones, mantenimiento, limpieza, sanitización, operación, manipulación aséptica de los componentes y del producto, la transferencia, el muestreo, el monitoreo y otras intervenciones inherentes al PA, incluidos los trabajos de mantenimiento correctivo y/o preventivo.
- Deberá estar bajo la autoridad de una persona que se encuentre calificada en técnicas utilizadas en la fabricación de estos productos y que posea el conocimiento científico en su fabricación y manejo,

incluyendo especialistas en áreas de conocimiento requeridas de acuerdo a la naturaleza del producto y de los procesos. ²¹

- Las personas responsables de la producción y el control de calidad deben contar con una adecuada formación y experiencia práctica en disciplinas científicas relevantes al proceso, como por ejemplo, microbiología, biología, biometría, química, medicina, farmacia, farmacología, virología, inmunología, biotecnología y medicina veterinaria.³⁹
- Durante la jornada de trabajo el personal no deberá pasar de las áreas con exposición a microorganismos vivos o microorganismos modificados genéticamente, tejidos animales, toxinas, venenos o animales a áreas donde se manejan otros productos (inactivados o estériles) o diferentes organismos a menos que existan medidas de descontaminación efectivas, incluyendo el cambio completo de indumentaria (cambio completo de la ropa, los zapatos apropiados y la ducha, si corresponde). ^{21,39}
- Las restricciones de paso del personal a las áreas y las medidas de control para evitar contaminación del producto, deberán estar basadas en la gestión del riesgo.
- Deberán implementarse medidas equivalentes para empleados temporales, contratistas, auditores o alguna otra persona previamente autorizada que deba ingresar a las áreas.
- Deberá existir un programa de capacitación del personal en prácticas de bioseguridad y contención biológica; el programa debe incluir al personal directo, al indirecto, al fijo o al contratado de forma temporal.

La calificación del personal de las áreas asépticas debe realizarse una vez concluidas apropiadamente la capacitación y el entrenamiento. Los

requisitos para dicha calificación deberán encontrarse asentados en un procedimiento y tener los registros de los resultados, con el fin de avalar la calificación. Entre las pruebas se deberá incluir la exitosa participación durante una simulación de PA realizando la mismas funciones o actividades que efectuará durante la producción real.

Posteriormente, el personal debe participar regularmente en un programa de entrenamiento continuo. El personal de supervisión debe evaluar rutinariamente la conformidad de cada operador con los procedimientos escritos durante las operaciones reales. Del mismo modo, la unidad de control de calidad debe proporcionar una supervisión regular de la adherencia a los procedimientos establecidos y escritos y la técnica aséptica durante las operaciones de fabricación.

g. Control Ambiental

La NOM-059-SSA1-2015 define al Programa de monitoreo ambiental, como el establecimiento de una secuencia cronológica de actividades con el fin de evaluar el cumplimiento de los parámetros establecidos de partículas viables y totales en un ambiente controlado, y según la FEUM, un programa de control ambiental debe ser capaz de detectar oportunamente una desviación adversa de las condiciones microbiológicas de modo tal que permita tornar acciones correctivas significativas y eficaces.

Puesto que el control de partículas totales en ambientes controlados no suministra información acerca del contenido microbiológico del ambiente, los programas de control microbiano deben evaluar la eficacia de las prácticas de limpieza y desinfección realizadas por el personal que podrían afectar la biocarga del ambiente controlado y así mediante el control microbiológico ambiental y el análisis de datos por parte del personal calificado, mantener un estado de control en cuartos limpios y ambientes.

A continuación, se enlistan recomendaciones generales a considerar para el Control Ambiental, proporcionados por la FEUM (SUPLEMENTO, 2016) y la OMS ("GMP for Biological Products Guideline"):

- Es responsabilidad del fabricante desarrollar, iniciar, implementar y documentar tal programa de control ambiental microbiológico, ajustándolo a las instalaciones y condiciones específicas.
- El control microbiano independientemente del diseño del sistema no requiere forzosamente identificar y cuantificar todos los microorganismos presentes en los ambientes controlados, sin embargo, debe realizarse un muestreo del ambiente durante la operación normal para recopilar datos significativos, este debe realizarse cuando se encuentre el personal operativo completo, los materiales se encuentren en la zona de trabajo y se estén desarrollando las actividades de proceso.
- El control microbiológico de cuartos limpios y algunos otros ambientes controlados, cuando corresponda, debe incluir monitoreo de: aire ambiental, aire comprimido y/u otros gases que se empleen en la zona crítica, superficies, equipos, recipientes de desinfección, pisos, paredes y la vestimenta del personal (por ejemplo: guantes, overoles).
- Todo lo anterior tiene el objetivo de obtener estimaciones representativas de la biocarga del ambiente, es decir, cuando se tengan los datos recopilados y analizados, el personal capacitado debe evaluar las tendencias, mediante la construcción de graficas de control estadístico que incluyen niveles de alerta y de acción, a una frecuencia recomendada y especificada para que, en caso de exceder los niveles microbianos especificados, emitir informes o resúmenes para alertar al gerente responsable y realizar una revisión de la documentación y una investigación.

- La investigación debe incluir una revisión de la documentación de mantenimiento de la zona, documentación de desinfección, parámetros físicos u operativos inherentes tales como cambios de temperatura y humedad relativa y la capacitación del personal involucrado, todo lo anterior dependerá del sitio de muestreo que se encuentre fuera de especificación.
- Entre las acciones a tomar podrían incluirse el refuerzo de capacitación del personal para enfatizar el control microbiano del ambiente; muestreos adicionales y más frecuentes, desinfecciones adicionales, análisis adicionales de los productos, identificación del contaminante microbiano y su probable origen y determinar la necesidad de reevaluar los procedimientos normalizados de operación vigentes y si fuera necesario, llevar a cabo los cambios pertinentes y validarlos.
- Debe existir un programa de monitoreo ambiental de aire, superficies y personal descrito en un Procedimiento Normalizado de Operación (PNO).
- Los sitios de muestreo deben ser seleccionados con una justificación basada en la gestión del riesgo y ser considerados dentro de la calificación del sistema HVAC.
- Debe asegurarse que los equipos e instrumentos así como los métodos de muestreo que se utilicen para realizar los controles en proceso no se vean afectados directa o indirectamente por el proceso y viceversa.³⁹
- El programa de monitoreo ambiental en condiciones dinámicas debe complementarse con métodos para detectar la presencia de microorganismos específicos utilizados para la producción (por ejemplo, levaduras recombinantes y bacterias productoras de toxinas o polisacáridos). Este programa puede incluir la detección

de los organismos producidos y los agentes adventicios de los organismos de producción, especialmente cuando la fabricación de campañas se aplica sobre la base de los principios de Gestión de Riesgos de Calidad (QRM).

Las pruebas de monitoreo deben repetirse durante el control de rutina del cuarto limpio o del ambiente controlado y siempre que se realicen cambios importantes en el funcionamiento, proceso, flujo de personal, operación, flujo de materiales, sistemas de manejo de aire o distribución de equipos, garantizando que la biocarga del ambiente cumple los requisitos para el PA.

III. Filtración Aséptica

Ciertas soluciones y líquidos que no resistan ser esterilizados por esterilización terminal pueden filtrarse a través de un filtro estéril de tamaño de poro de $0.22\mu\text{m}$, en un contenedor previamente esterilizado. Sin embargo, es importante considerar la posibilidad de complementar el proceso de filtración con algún grado de tratamiento térmico puesto que estos filtros no permiten deshacerse de todos los virus o micoplasmas.

Dado que este método implica un mayor manejo y manipulación, en comparación con otros procesos de esterilización, tiene un alto potencial de contaminación durante el procesamiento. Es conveniente utilizar doble capa de filtro o realizar una segunda filtración a través de un filtro de retención de microorganismos previo al llenado. La filtración estéril final debe realizarse lo más cerca posible del punto de llenado.

A continuación, se enlistan aspectos básicos a considerar para la Filtración Aséptica, proporcionados por La NOM-059-SSA1-2015 y la OMS ("Good Manufacturing Practices for Sterile Pharmaceutical Products"):

- Todas las soluciones, en particular fluidos de perfusión de gran volumen, se deben pasar a través de un filtro de retención de

microorganismo, de ser posible, este deberá estar situado inmediatamente antes del llenado.

- Cualquier gas que se utilice para purgar una solución o desplazar el aire del producto, se debe pasar a través de un filtro de esterilización.
- La adición de sustratos, soluciones reguladoras, antiespumantes, soluciones para el ajuste de acidez o alcalinidad debe realizarse a través de un puerto que garantice la transferencia estéril de esos componentes o a través de filtros de esterilización.
- La biocarga debe controlarse antes de la esterilización; debe haber límites sobre la biocarga antes de la esterilización, la cual debe estar relacionada con la eficiencia del método a utilizar. Se debe determinar la biocarga en cada lote, tanto para productos llenados asépticamente como para los que llevan esterilización terminal.
- El tiempo de uso del filtro debe ser considerado en la validación y establecerse, además debe realizarse la prueba de integridad a los filtros utilizados en el proceso de filtración antes y después de su uso.
- Los filtros empleados en la producción o envasado primario de productos deben ser de materiales que no liberen fibras u otros cuerpos extraños. Las características de desprendimiento de fibra de los filtros deben ser mínimas, prácticamente cero. Los filtros que contienen asbesto no deben utilizarse en ninguna circunstancia.
- El mismo filtro no debe utilizarse durante más de un día hábil, a menos que dicho uso haya sido validado, además este no debe afectar al producto, ya sea eliminando los ingredientes o liberando sustancias en él.

- La integridad del filtro esterilizado debe confirmarse inmediatamente después de su uso mediante un método apropiado, como un punto de burbuja, flujo difusivo o prueba de presión.
- El tiempo requerido para filtrar un volumen conocido de solución a granel y la diferencia de presión que se utilizará en el filtro se debe determinar durante la validación y cualquier diferencia significativa de estos durante la fabricación normal debe documentarse e investigarse, estos resultados deben incluirse en el registro de lote.
- La integridad de los filtros críticos de gas y aire debe confirmarse después del uso. La integridad de otros filtros debe ser confirmada a intervalos apropiados.
- En procesos que involucran condiciones severas, por ejemplo, la circulación del aire a alta temperatura, requieren considerar un mayor monitoreo de la integridad del filtro.

IV. Llenado Aséptico

Una vez finalizado el proceso de producción y haber obtenido la Sustancia activa final a granel, es decir, el biofármaco o mAb, este es mantenido en uno o más recipientes de donde posteriormente se dispone a formularse y se llena en recipientes sellados finales que mantienen el producto en su forma de dosificación final, en otros términos, el producto terminado o producto biotecnológico, este deberá ser llenado de manera aséptica ya que como se ha abordado anteriormente en este trabajo escrito, en el proceso de fabricación de mAb, existe un riesgo de contaminación latente en cada operación, sin embargo el procedimiento de llenado final es el proceso aséptico más crítico y se debe realizar en un entorno controlado.^{8,31}

Previamente en la secciones "Áreas" y "Filtración Aséptica" se señaló que el llenado aséptico se realiza en áreas controladas y

separadas físicamente, "Clase A" o "ISO Clase 5", con entornos "Clase B", y que los procesos de formulación y llenado de biotecnológicos sólo podrán efectuarse en áreas de fabricación comunes de productos estériles siempre y cuando exista una autorización previa de la COFEPRIS, además todas las soluciones, se deberán pasar a través de un filtro de retención de microorganismo antes de este proceso.

Dependiendo en gran medida del diseño de la instalación, el tamaño del lote y el diseño del envase se enfocará la elección de la tecnología a emplear en el proceso de llenado, las plantas más antiguas utilizan cuartos asépticos en los que el personal vestido de manera igualmente aséptica maneja el equipo de llenado, es decir, realiza la configuración, suministra los componentes, ejecuta los ajustes necesarios y el monitoreo ambiental. Al ser los operadores humanos los responsables directa o indirectamente de prácticamente toda la contaminación microbiana, las operaciones de llenado aséptico cada vez más están encaminadas a minimizar esta posibilidad de contaminación, es decir que el operador ingrese en el entorno crítico. La producción exitosa de mAb (parenterales por PA) requiere un entorno en el que los microorganismos y las partículas estén muy bien controlados. Por lo anterior se recomienda emplear barreras de diversa sofisticación y eficacia, que reducen la intervención humana durante este proceso crítico, con el propósito de aumentar la protección otorgada a los materiales y sustancias estériles.²⁸

En las siguientes secciones se abordarán cada uno de los sistemas utilizados en el PA.

I. Sistemas de Barrera de Acceso Restringido (RABS)

Muchas instalaciones nuevas utilizan tecnología de aislamiento en la que el entorno de llenado está completamente cerrado por lo que se evita completamente la contaminación del personal. Los diseños de sala limpia más evolucionados son los RABS, donde las intervenciones del personal

están restringidas a ubicaciones definidas limitando el acceso del personal al ambiente crítico mediante sistemas mecánicos y de barrera, la combinación formada por una barrera física y un flujo de aire dinámico permite protección al producto cercana a la de un aislador. Estos sistemas son sujetos a una desinfección profunda antes de su uso y después de cada apertura.^{28,31}

II. Soplado-Llenado-Sellado (BFS)

BFS es un sistema único donde el contenedor final se forma como un contenedor estéril justo antes de la etapa de llenado aséptico. Su ventaja incluye el procesamiento rápido de cierre de contenedores e intervención aséptica minimizada, sin embargo, es indispensable el control del contenido de endotoxinas en las perlas de LDPE (Polietileno Baja Densidad), las cuales son utilizadas para crear los contenedores, así como las condiciones de fusión utilizadas para formarlos.^{10,28}

El PA llevado a cabo en tecnología BFS implica algunas condiciones, a continuación, se enlistan recomendaciones generales a considerar para la validación de este sistema, de acuerdo a La NOM-059-SSA1-2015 (sección 10.4 "Sistemas de producción de productos estériles."), la FEUM (SUPLEMENTO, 2016) y la FDA ("Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice"):

- Atender la configuración, problemas del equipo y procedimientos relacionados con el personal, prestando particular atención a las intervenciones que impliquen operaciones manuales en las áreas de soplado, cortado y ajuste/remoción, área de exposición de las boquillas de llenado, conexiones asépticas, y maniobras posteriores a la filtración.

- Prestar particular atención a la esterilización del equipo, el llenado, la extrusión/esterilización de polímeros, la compatibilidad del producto con el plástico, la integridad del sellado y la variación del peso por unidad.
- Garantizar que los contenedores BFS sean estériles y no pirogénicos a través de la validación de las condiciones de temperatura del proceso de extrusión, asegurando que son efectivas contra endotoxinas o esporas.
- Retos al material polimérico; evaluando si este es de calidad farmacéutica, seguro, puro y cumple con los criterios apropiados para plásticos. Además, los proveedores de polímeros deben estar calificados y monitoreados con el objetivo de asegurar la calidad de la materia prima.
- Se debe atender la posibilidad de generación de fugas después del llenado por fallos en la operación de eliminación de los sobrantes del envase.
- Otros aspectos relevantes o indispensables son la calificación de equipo; validación de limpieza y esterilización; el entorno en el que se debe encontrar el equipo, "Clase A" o "ISO Clase 5", con entornos "Clase B"; capacitación de los operadores y las intervenciones en la zona crítica del equipo incluyendo cualquier montaje aséptico antes del comienzo de llenado, es imprescindible que sólo el personal que ha sido calificado y vestido adecuadamente pueda entrar en el entorno clasificado que rodea la maquinaria BFS.

III. Aisladores

El PA que utiliza sistemas de aislamiento separa el entorno de la sala limpia externa de la línea de PA y elimina, mientras su operación se mantenga bajo control, la exposición del producto al personal. Los

aisladores están contruidos con varios materiales más o menos propensos a la perforación y las fugas. Los dispositivos de transferencia pueden variar desde diseños de una puerta, puertas dobles, hasta sistemas completamente sellados que incorporan mecanismos de esterilización. La transferencia de materiales dentro y fuera de la unidad puede constituir una de las fuentes potenciales de contaminación.^{10,21,38}

Pese a que ningún aislador forma un sello absoluto, se puede lograr una integridad muy alta en una unidad de presión positiva bien diseñada, respaldado por procedimientos adecuados para su mantenimiento, monitoreo y control. Sin embargo, cualquier fuga en ciertos componentes del sistema puede constituir una violación de la integridad del sistema, así, los usuarios deben permanecer atentos a las posibles fuentes de riesgo operacional. A continuación, se destacan aspectos relevantes a considerar de acuerdo con La FDA (“Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice”):

- La integridad de los guantes, los trajes y las costuras deben recibir atención diaria y ser incluidos en programas de mantenimiento preventivos, las frecuencias de reemplazo deben establecerse en procedimientos escritos que aseguren que las partes se cambien antes de que se rompan o degraden, esto, debido a que un conjunto de guante o manga defectuoso representa una ruta de contaminación y un incumplimiento crítico de la integridad del aislador.
- Con cada uso, los guantes deben evaluarse visualmente para detectar cualquier defecto físico macroscópico. Las pruebas de integridad física también deben realizarse de forma rutinaria.
- Debe existir un programa de seguimiento y mantenimiento con la finalidad de identificar y eliminar cualquier guante que carezca de

integridad y minimizar la posibilidad de poner en riesgo un producto estéril.

- Debido al potencial de migración microbiana a través de orificios microscópicos en los guantes se recomienda integrar el uso de un segundo par de guantes finos.
- Los sistemas de transferencia, las juntas y los sellos se encuentran entre las otras partes que deben estar cubiertas por el programa de mantenimiento.
- El interior del aislante debe cumplir con los estándares de la Clase A o ISO Clase 5.

El PA llevado a cabo en Aisladores implica algunas características especiales para la validación de estos sistemas, a continuación, son enlistadas, de acuerdo a La NOM-059-SSA1-2015 y la OMS (“Good Manufacturing Practices for Sterile Pharmaceutical Products”):

- El uso de aisladores debe cumplir la calidad del aire requerida para el proceso y producto que se manejen en éstos.
- La clasificación del área donde se coloque el aislador depende del diseño del aislador y su aplicación, sin embargo, debe colocarse en un área Clase D como mínimo.
- Deben contar con un sistema de monitoreo de las variables críticas incluidas la prueba de fuga del aislador y la de los guantes.
- Los aisladores deben introducirse a operación solo después de la validación apropiada.
- La validación debe tener en cuenta todos los factores críticos de la tecnología del aislador, por ejemplo, la calidad del aire interior y exterior (fondo) del aislador, la desinfección del aislador, el proceso de transferencia y la integridad del aislador.

IV. Simulación de Procesamiento Aséptico (SPA)

La etapa final de la validación del PA es llevada a cabo mediante la SPA, donde el producto es sustituido por medio de cultivo, simulando el proceso de fabricación "normal" de los operadores, el medio ambiente, el equipo y las superficies, que se produciría durante la fabricación (desde el punto de filtración hasta el cierre del envase del producto) de rutina, posteriormente, las unidades llenadas con el medio de cultivo son incubadas en condiciones que promueven el crecimiento de microorganismos, lo cual permitirá detectar posible contaminación microbiológica que ingrese al producto durante o después de su sellado cuando las condiciones del PA no son las adecuadas.^{28,31}

Las pruebas de llenado simulado normalmente incluyen la exposición del medio de cultivo microbiológico a:

- Las superficies de contacto del producto con el equipo.
- Sistemas Contenedor-Cierre.
- Ambientes Críticos.
- Manipulaciones que simulen las mismas condiciones de exposición del producto real en la fabricación comercial.

Posteriormente los resultados se evalúan e interpretan para determinar el riesgo potencial de que alguna unidad del producto fabricado se contamine durante el proceso de fabricación normal del producto (por ejemplo: en adiciones de ingredientes, conexiones asépticas, llenado, cierre o taponado). Cabe destacar que los datos de monitoreo ambiental durante el proceso de llenado simulado proveen información importante para la evaluación del proceso.³¹ A continuación, en la Ilustración 4 se ejemplifica un "Diagrama de flujo para la SPA."¹⁴

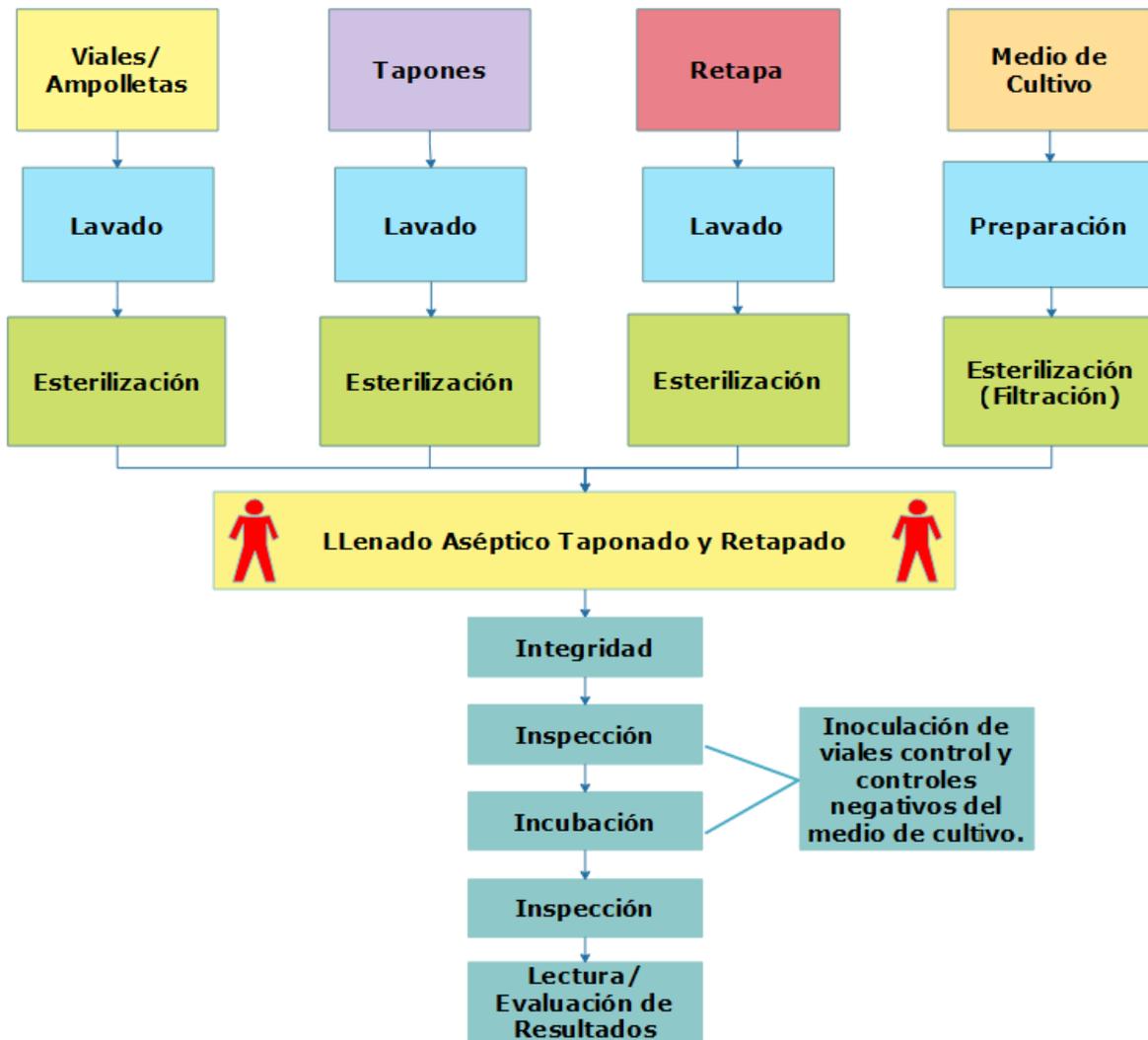


Ilustración 4 Diagrama de flujo para la SPA. ¹⁴

Existen diferentes aspectos a considerar sobre la SPA definidos por la NOM-059-SSA1-2015 (sección 10.4 "Sistemas de producción de productos estériles") y la FEUM (SUPLEMENTO, 2016), los cuales se describen a continuación:

- **Diseño del estudio:** Debe establecerse un programa de pruebas de llenado simulado que contemple los factores de riesgo de contaminación microbiológica que puedan ocurrir en la línea de fabricación mediante la continua gestión de los riesgos a la esterilidad del producto. La SPA debe semejar el PA real lo mejor posible incorporando actividades y condiciones para el "peor caso", retando las operaciones asépticas.

- Frecuencia y cantidad de corridas de llenado simulado:
 - Para nuevas instalaciones o procesos de fabricación, las pruebas de SPA se deberán realizar como parte de las actividades de validación. Es necesario que las pruebas iniciales SPA sean llevadas a cabo posterior a: calificación de equipo, calificación del sistema de HVAC, calificación del sistema de agua, validación del sistema de esterilización, implementación del sistema de monitoreo y control ambiental, calificación del personal que incluya técnicas de vestido y comportamiento en área críticas, y establecimiento de procedimientos normalizados de operación.
 - Si la línea de proceso se califica de manera inicial deberán efectuarse corridas de llenado simulado hasta asegurar que los resultados sean consistentes y significativos y se logre una operación en estado de control. Deberán hacerse un mínimo de tres 3 corridas consecutivas y separadas con resultados satisfactorios.
 - Las corridas subsecuentes de rutina serán determinadas con base en la gestión del riesgo inherente al proceso, ejecutándolas, al menos, cada 6 meses para cada línea de proceso, así como después de cualquier modificación significativa del sistema de aire acondicionado (HVAC), instalaciones, equipo, proceso o producto. a fin de evaluar el estado de control del PA.
 - En el diseño del programa se deberán incorporar las actividades e intervenciones representativas de cada turno durante la producción normal.
 - Todos los cambios a los productos y a las líneas de proceso, como; modificaciones de instalaciones, equipo, y líneas de

proceso, cambios significativos en el personal, resultados anómalos del control ambiental, cambios en el sistema contenedor/cierre y paros de actividad prolongados, deben ser evaluados a través del sistema de control de cambios, el cual debe considerar como inicio, la gestión del riesgo de la calidad, llevado a cabo por los expertos en el proceso.

- Siempre que se obtengan resultados positivos en una prueba de esterilidad en producto terminado, deberá hacerse una investigación a fondo de la o las causas raíz de estos resultados y, si dicha investigación y su correspondiente gestión del riesgo de la esterilidad así lo muestra, deberá revalidarse el sistema del PA.

- Duración de las corridas:
 - La duración y tamaño ideal de las corridas de llenado simulado son las mismas de la duración y tamaño de la fabricación de un lote comercial, con la intención de simular de mejor manera las operaciones normales de la fabricación.
 - De no ser posible el punto anterior, la duración deberá definirse con base en una valoración riesgos, tomando en cuenta las variables que determinen la mayor criticidad por lo que respecta al tiempo de duración.
 - El Tamaño de las corridas de SPA debe ser tal que reproduzca las condiciones y se determinen con exactitud la contaminación microbiológica potencial, de acuerdo con la Tabla 2 "Consideraciones para elegir el Tamaño de las corridas de SPA"³¹:

Lote de producción		Tamaño mínimo del lote de SPA (no. De contenedores llenos con medio de cultivo)	Recomendaciones
Descripción	Tamaño		
Pequeña escala	≤5,000	≤5,000	El tamaño del lote para la SPA debe ser, al menos, del mismo tamaño del lote de producción
Escala media	5,000 a 10,000 unidades	5,000 a 10,000 unidades	El tamaño del lote para la SPA debe ser, comparable al lote de producción
Gran escala	≥ 10,000 unidades	>10,000 unidades.	
Llenado Manual	Cualquier cantidad	Mismo tamaño del lote de producción	El tamaño del lote para la SPA debe ser, al menos, del mismo tamaño del lote de producción

Tabla 2 Consideraciones para elegir el Tamaño de las corridas de SPA. ³¹

Cabe destacar que para lotes menores a 5,000 unidades el número de piezas llenadas debe ser, al menos, igual al tamaño del lote del producto.

- Velocidad de la línea:
 - El programa de SPA debe considerar el rango de velocidades usadas en la producción comercial.
 - Cada corrida de llenado simulado se debe evaluar una velocidad determinada de la línea y la velocidad debe ser justificada. Una alta velocidad es apropiada para un proceso con intervenciones frecuentes. El uso de la prueba a baja velocidad es apropiado para la evaluación de procesos con exposición prolongada de producto estéril y contenedores y/o tapones en el área aséptica.
 - Para determinar las velocidades a evaluar se debe tomar en cuenta el análisis de riesgos del PA.
- Condiciones ambientales: Es decir, partículas totales y partículas viables, deben ser monitoreadas a lo largo de toda la SPA.
- Medios de cultivo:
 - Los medios seleccionados para SPA deben demostrar la promoción del crecimiento de bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos y levaduras, aerobios y anaerobios. Además, su selección debe hacerse con base al tipo de dosificación del producto, selectividad, claridad, concentración e idoneidad para la esterilización del medio.
 - Las pruebas de promoción de crecimiento deben llevarse a cabo con estos mismos microorganismos.

- El proceso de fabricación debe ser simulado con exactitud usando medios de cultivo y condiciones que faciliten la detección de cualquier contaminación microbiológica.
- Cada unidad debe ser llenada con una cantidad y tipo de medio de cultivo suficiente y, posteriormente, rodarlas con el propósito de que el medio de cultivo entre en contacto con toda la superficie interna del envase.
- Incubación y examen:
 - Se debe llevar a cabo para todas las unidades llenadas con medio de cultivo.
 - La incubación debe estar bajo condiciones adecuadas para la detección de microorganismos.
 - La temperatura de incubación debe ser adecuada para recuperar los aislamientos de la biocarga y del medio ambiente y deben permanecer en el rango entre de 20°C - 35°C, +/- 2.5 °C.
 - El tiempo de incubación no debe ser menor de 14 días. Si se utilizan dos temperaturas de incubación, las unidades deberán ser incubadas por lo menos 7 días a cada temperatura, comenzando por la temperatura más baja.
 - Cada unidad llenada con medio de cultivo debe ser examinada por personal calificado con conocimientos, capacitación y experiencia en inspección de unidades con medio de cultivo para detección de contaminación microbiológica.
- Interpretación de los resultados:
 - La corrida de llenado simulado debe ser observada por Control de Calidad.

- Las unidades contaminadas deben reconciliarse con el tiempo aproximado y la actividad durante la corrida. La grabación en video de la corrida de llenado simulado puede ser útil para identificar las prácticas del personal que pudieran afectar negativamente el PA y poder correlacionar estas con el período en el que aparecieron las unidades contaminadas.
- Para cualquier tamaño de corrida, los incidentes intermitentes de contaminación microbiana pueden ser indicativos de contaminación de bajo nivel, el cual debe investigarse; por ello, cualquier unidad contaminada debe considerarse objetable y ser investigada, además de investigarse las posibles causas raíz de la contaminación, se debe investigar los microorganismos hasta la especie, para lo cual se deberá mantener un cepario en Microbiología de las cepas más comunes que se presentan en las áreas asépticas.
- La investigación de fallas debe incluir el impacto potencial sobre la garantía de la esterilidad de los lotes fabricados desde el último estudio de llenado simulado exitoso.

Los criterios de aceptación para las pruebas de llenado simulado se muestran a continuación:

Tamaño de prueba	Una unidad contaminada		Dos unidades contaminadas	
	Investigación de causa raíz	Revalidación	Investigación de causa raíz	Revalidación
Llenado menor de 5,000 unidades	✓	✓	-	-
Llenado entre 5,000 y 10,000 unidades	✓	-	✓	✓
Llenado de más de 10,000 unidades	✓	-	✓	✓

Tabla 3 Criterios de Aceptación para las pruebas de llenado simulado. ³¹

La SPA culmina en la incubación de los contenedores llenos de medios y los resultados obtenidos muestran la tasa de contaminación para el llenado de medios.

El Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad (NAE) proporcionado por el PA depende principalmente de dos factores: la tecnología empleada y el personal que lleva a cabo el proceso. Es indispensable aplicar los principios de gestión de riesgo desde el diseño del PA con el fin de asegurar un NAE aceptable.³¹ En la actualidad, el nivel de esterilidad proporcionado a los materiales procesados de forma aséptica no se puede medir.²⁸

A pesar de lo anterior en el caso de los procedimientos de preparación, llenado y producción asépticos, se considera que la probabilidad media de contaminación es de 10^{-3} . Y en los procesos automatizados, se puede llegar a alcanzar menores tasas de contaminación, como por ejemplo en el caso de los RABS 10^{-4} y para los aisladores 10^{-5} .³⁴

Al culminar exitosamente la SPA se demuestra la capacidad de un proceso aséptico específico para producir productos farmacéuticos estériles, calificar o certificar al personal de PA y cumplir con los requisitos reglamentarios.²³

11. **Discusión**

Como se abordó a lo largo de este trabajo el control de la esterilidad en la fabricación de Productos Biotecnológicos es de importancia crítica y para garantizar la calidad establecida en los mAb se requiere un análisis y control exhaustivo de los factores ambientales del proceso de fabricación, estos son, el aire, el agua, las superficies y las personas involucradas en el proceso. Además del control ambiental, que juega un papel crucial como estrategia de control de biocarga durante el bioproceso, filtración del biofármaco, formulación y llenado existen otras operaciones unitarias relevantes que requieren ser validadas previo a iniciar el Procesamiento Aséptico, como se muestra en la Tabla 4 “Elementos necesarios a considerar para la correcta Validación del Procesamiento Aséptico en la Fabricación de Productos Biotecnológicos” estas son: Procedimientos, Áreas, Sistema HVAC, Sistemas críticos, Esterilización del producto y demás componentes, Integridad del sistema contenedor-cierre, Limpieza y Esterilización de equipos y Calificación de Personal. Por lo tanto, inicialmente al ejecutar la validación del PA, el aire debe ser debidamente filtrado, el sistema HVAC debe ser monitoreado regularmente y mantenido de manera efectiva para suministrar a las áreas dedicadas la calidad de aire limpio esperado, asimismo, la presión de la habitación debe ser la adecuada al tipo de área, se debe evitar la contaminación cruzada a través de flujos lógicos y unidireccionales de personal, materiales y procesos, el equipo y los materiales deben limpiarse, desinfectarse y/o esterilizarse antes y después de su uso, conjuntamente el uso de sistemas de limpieza y esterilización en sitio deben considerarse siempre que sea posible, el personal debe encontrarse capacitado y calificado en el uso y seguimiento de las técnicas asépticas con el fin de reducir las prácticas que puedan agregar carga biológica al producto, además de contar con ropa limpia y esterilizada, los componentes y equipos utilizados en la producción aséptica deben ser esterilizados, igualmente los filtros de esterilización del biofármaco con

prefiltros asociados deben monitorearse adecuadamente y mantenerse en condiciones óptimas.

Se debe considerar en la medida de lo posible el uso de sistemas cerrados para mejorar la asepsia y la contención. Todo el procesamiento de productos biotecnológicos antes del llenado final, o sea, todos los procesos biológicos críticos (incluida la inoculación, multiplicación, fermentación, ruptura celular, inactivación, purificación, eliminación de virus, eliminación de aditivos tóxicos y dañinos, filtración y formulación) deben mantenerse, en un entorno de baja carga biológica, esto es, que cada una de las actividades que se efectúen en el PA se lleven a cabo con el objetivo de reducir la probabilidad de riesgo al nivel más bajo aceptable.

Para culminar la validación del PA la Simulación del Procesamiento Aséptico, proporcionará la información necesaria para establecer el riesgo potencial de contaminación del producto durante el proceso de fabricación normal y con esto poder establecer las acciones pertinentes para reducirlo.

Elementos necesarios a considerar para la correcta Validación del Procesamiento Aséptico en la Fabricación de Productos Biotecnológicos.	
Operaciones Unitarias, a validar previamente, involucradas en el PA	Operaciones a realizar en la etapa final de la validación del PA
Procedimientos	Llenado Aséptico
Áreas	Simulación de Procesamiento Aséptico
Sistemas Críticos	

Esterilización del producto y demás componentes	
Integridad del sistema contenedor-Cierre	
Limpieza y esterilización de equipos	
Calificación de Personal	
Control Ambiental	
Filtración Aséptica	

Tabla 4 Elementos necesarios a considerar para la correcta Validación del Procesamiento Aséptico en la Fabricación de Productos Biotecnológicos.

12. Conclusiones

Se puede sugerir que a través de este trabajo escrito se lograron establecer cada uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta para la exitosa validación del Procesamiento Aséptico en la fabricación de Productos Biotecnológicos, todo ello posterior a cumplir el pertinente proceso de investigación, recopilación y análisis de los puntos de referencia establecidos en los objetivos de este trabajo, es decir, las normativas nacional e internacional, así como artículos de investigación y guías pertinentes.

13. Referencias

1. Abhinav A. Shukla. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology, Vol 28*, 253-261.
2. Angela FaustinoJozala, et. al. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology, Vol 47*, 51–63.
3. Animal Cell Technology Industrial Platform. (1 de Enero de 2020). *Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use*. Obtenido de <https://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>
4. CAS, C. D. (2018). LISTADO DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS INNOVADORES. *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios*.
5. Daniel López et. al. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol Vol 2*, 7.
6. Dumont J. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology, Vol 36*, 1110-1122.
7. Duncan Low, et. al. (2007). Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B, Vol 848 Num 1*, 48-63.
8. European Medicines Agency. (1995). Production And Quality Control Of Monoclonal Antibodies. *EMA*.
9. European Medicines Agency. (2016). Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products. *EMA*.
10. FDA, F. a. (2004). Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing—Current Good Manufacturing Practice . *U.S. Department of Health and Human Services* .

11. Feng Li. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *Journal mAbs Vol 2*, 466–477.
12. Garnick RL, et. al. (1991). Characterization of proteins from recombinant DNA manufacture. *Bioprocess Technol. Vol 13*, 263-313.
13. Hallaj-Nezhadi, Farzaneh Lotfipour and Somayeh. (2012). Latest Research into Quality Control: Chapter 9, Microbial Quality Concerns for Biopharmaceuticals. London: IntechOpen Limited.
14. Health Canada. (2003). Process Validation: Aseptic Processes for Pharmaceuticals. *Health Products and Food Branch Inspectorate*.
15. Houdebine, Louis-Marie. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Vol 32 Num 2*, 107-121.
16. J, Gonçalves. (2016). Biosimilar monoclonal antibodies: preclinical and clinical development aspects. *Clin Exp Rheumatol, Vol 34, Num 4*, 698-705.
17. K., Hanack. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Protein Targeting Compounds. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 917.
18. Lee, C. et al. (2008). A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng., 102*, 1107-1118.
19. Lucia Clontz, et. al. (2013). Biopharmaceutical Microbial Contamination Control, Processes, equipment, facilities, and systems to prevent microbial contamination. *Pharmaceutical Processing, Vol 28, Num 2*, 16-21.
20. Mostafa Eissa, et al. (2017). Bioburden Control in the Biopharmaceutical Industry. *Biopharm International, Vol 30, Num 10*, 24-27.

21. NOM-059-SSA1-2015. (05 de Febrero de 2016). Norma Oficial Mexicana, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. *Diario Oficial de la Federación*.
22. NOM-EM-001-SSA1-2012. (17 de Abril de 2012). Norma Oficial Mexicana de Emergencia, Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos p. *Diario Oficial de la Federación*.
23. Northeast Biomanufacturing Center & Collaborative. (2012). *Introduction to Biomanufacturing Center and Collaborative (NBC2)*. PA, Estados Unidos: Global Biomanufacturing Curriculum.
24. PIC/S, P. I.-O. (2011). RECOMMENDATION ON THE VALIDATION OF ASEPTIC PROCESSES. ©PIC/S.
25. Rietschel ET, et. al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J. Vol. 8, No. 2*, 217-225.
26. Salema, Valencio, et. al. (2009). Removing endotoxin from biopharmaceutical solutions. *Pharmaceutical Technology Europe, Vol 25 Num 9*.
27. Secretaría de Salud. (1992). Ley General de Salud. *Diario Oficial de la Federación*.
28. Shayne Cox Gad, PH.D., D.A.B.T. (2008). *PHARMACEUTICAL MANUFACTURING HANDBOOK, Production and Processes*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
29. Shepard HM. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond). Vol 3*, 220-232.
30. Stephen P. Denyer, Rosamund M. Baird. (2007). Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press.

31. SUPLEMENTO FEUM: Esterilización. (2016). En S. d. Salud, *FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS* (págs. 73-85). Ciudad de México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
32. Tapan K.Das et al. (2020). Stress Factors in mAb Drug Substance Production Processes: Critical Assessment of Impact on Product Quality and Control Strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 109, Num 1*, 116-133.
33. USP 41–NF 36. (2018). En C. d. América, *Farmacopea de los Estados Unidos de América, Volumen 5* (pág. <1231> 7747).
34. Von Woedtke, T., & Kramer. (2008). A. The limits of sterility assurance. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär. vol. 3,3*, Doc19.
35. W, Sommeregger. (2017). Quality by control: Towards model predictive control of mammalian cell culture bioprocesses. *Biotechnology Journal, Vol 12, Num 7*.
36. Wei Wang et al. (2014). Impact of Residual Impurities and Contaminants on Protein Stability. *J Pharm Sci. Vol 103, Num 5* , 1315-1330.
37. Wong, D. et al. (2004). Impact of dynamic on-line fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng Vol 89*, 164-77.
38. World Health Organization. (2011). WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products. *WHO/DRAFT/11*.
39. World Health Organization. (2015). WHO GMP for Biological Products. *WHO/DRAFT/18 February 2015* .
40. Yanan Cui, et. al. (2017). Monoclonal antibodies: formulations of marketed products and recent advances in novel delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy, Vol 43*, 519-530.

41. Yigzaw, Y. et al. (2006). Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification. *Biotechnol. Progr.* Vol 22, 288-96.