

Evaluación de la filtración esterilizante del IFA-HBsAg

✉ Alejandro Beldarraín¹, Yanelis Robainas¹, Nancy Pentón¹, Francis Hernández¹, Yamilé Mendoza¹, Manuel Rodríguez¹, Juana M Hernández², Lisbet Melo², Yenay Díaz², Soraya Piloto², César Quintero³, Daylon Pérez¹, Boris Menéndez¹, Ayankay Vidal¹

¹ Departamento Hepatitis B. Planta de Producción

² Laboratorio de Microbiología. Dirección de Calidad

³ Grupo Calpis. Departamento de Ingeniería. Planta de Producción

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB

Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba

E-mail: alejandro.beldarraín@cigb.edu.cu

RESUMEN

Se evaluó el procedimiento de filtración esterilizante del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna cubana antihepatitis B recombinante (IFA-HBsAg), usando membranas planas 113 y cápsulas Sartobran P (Sartorius, Alemania) como medio filtrante. El estudio de los procesos de esterilización con vapor saturado para dos cargas: una para membranas planas en sus carcazas, y otra para materiales auxiliares, demostró que los puntos medidos alcanzan un $F_0 > 15$ minutos, lo que garantizó una correcta esterilización. La integridad física de ambos medios filtrantes se mantuvo antes y después del proceso de filtración, lo que indicó una operación exitosa. El estudio de extractables por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (EIRTF) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (CLAR-FI), mostró la ausencia de compuestos contaminantes provenientes de las membranas. La prueba de retención bacteriana a escala industrial, simulando las operaciones con tampón e IFA-HBsAg, reveló que ambos medios filtrantes pueden retener una carga microbiológica de $\geq 10^7$ u.f.c./cm² de *Brevundimona diminuta*, lo que garantiza la esterilidad del material filtrado. Estos resultados indican la garantía y seguridad del proceso de esterilización del IFA-HBsAg.

Palabras clave: filtración esterilizante, esterilización por calor húmedo, simulación de la filtración, integridad de membranas, análisis de extractables, reto microbiológico

Biotecnología Aplicada 2009;26:237-243

ABSTRACT

Evaluating sterilizing filtration for API-HBsAg. The sterilizing filtration procedure for the active pharmaceutical ingredient of the Cuban anti-hepatitis B vaccine (HBsAg API) was evaluated by using cellulose nitrate type 113 membranes and Sartobran P capsules (Sartorius, Germany). The study of sterilization processes using saturated steam for two loads, one for the flat membranes within their respective carcasses and the other for auxiliary materials, demonstrated that the measuring points reached an $F_0 > 15$ minutes, guaranteeing an appropriate sterilization. The physical integrity of both filtration media was maintained after the filtration process, indicating a successful operation. The extractables were studied by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIRS) and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), showing the lack of membrane-derived contaminants. The bacterial retention test was carried out at industrial scale simulating the operations used for the buffer and HBsAg API. Both filtration media were able to remove a microbiological load of $\geq 10^7$ c.f.u./cm² of *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146), ensuring filtrate sterility. These results indicate that the API HBsAg sterilization procedure is safe and reliable.

Keywords: Sterilizing filtration, steam sterilization, filtration simulation, integrity testing, extractable analysis, microbiological challenge test

Introducción

En correspondencia con las buenas prácticas de fabricación vigentes, los productos farmacéuticos deben tener establecidos los estándares y especificaciones que definan exactamente su calidad. Para un producto final o ingrediente farmacéutico activo (IFA), uno de los puntos críticos ampliamente regulado y controlado es la seguridad. Es preciso que no haya contaminación microbiológica que comprometa su acción específica, lo que se logra con tecnologías que garanticen un índice de letalidad, eliminación o retención máxima, en aquellos puntos críticos donde los microorganismos *potencialmente* puedan contaminar el producto [1-4].

La operación final en el proceso de producción de un IFA acuoso, generalmente es una filtración esterilizante por membrana de 0.2 μm que, en principio,

aporta seguridad al producto, lo cual tiene que ser probado [1-4]. Por lo tanto, para demostrar el desempeño de los sistemas de filtración esterilizante, es preciso el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación, y además, hay pruebas típicas que se deben desarrollar para cualquier sistema de filtración declarado aséptico. Las más importantes son la efectividad de los ciclos de esterilización, la determinación de integridad de los medios filtrantes, la capacidad de retención bacteriana con *Brevundimona diminuta* ATCC 19146 a $\geq 10^7$ u.f.c./cm² y el análisis de extractables del medio filtrante [1-4].

Cualquier operación de filtración está compuesta por varios pasos, que comienzan por la preparación de los materiales, su esterilización por calor húmedo,

1. Meltzer TH, Jornitz MW. Filtration in the pharmaceutical industry. Marcel Dekker Inc., New York; 1998.

2. International Organization for Standardization. Aseptic processing of health care products. Part 2: Filtration. ISO 13408-2:2003(E). ISO Copyright Office. Geneva, Switzerland; 2003.

3. PDA Technical Report. Sterilizing filtration of liquids. PDA J Pharm Sci Technol 1998;51:1-36.

4. Mills GJ, Bardo B. Biopharmaceutical Filtration Validation. Bioprocess Int 2006; 4(5):30-8.

la operación de filtración *per se*, la toma de muestras del proceso y el control ambiental. Por la complejidad de estas operaciones y su impacto sobre la calidad del producto final, este trabajo tiene como objetivo evaluar el proceso de filtración final esterilizante del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna antihepatitis B recombinante (IFA-HBsAg), utilizando membranas 113 y cápsulas Sartobran P tipo SO (Sartorius, Alemania), como medio filtrante.

Materiales y métodos

Materiales

Se emplearon membranas 113 de nitrato de celulosa de 0.2 μm con su portafiltros, y cápsulas Sartobran P con membranas de acetato de celulosa de 0.45 y 0.2 μm (Sartorius, Alemania). Los botellones de vidrio de 10, 15 y 20 L y sus accesorios, las tapas sifones para frascos de vidrio de 10, 15 y 20 L, las tuberías de silicona y conectores de 6 mm de diámetro interno, suministrados por fabricantes reconocidos. El sistema (Figura 1) opera dentro de una cabina de flujo laminar con clasificación ISO 5, ubicado en un área ISO 7.

Se emplearon además, los equipos Sartocheck Junior, BP-Plus ST166903 (Sartorius, Alemania), cabina de flujo horizontal BIO72 (ICEN, Cuba), Validator 2000 (Kaye Instruments Inc., EE.UU.), autoclave horizontal DLOV (De Lama, Italia), bomba peristáltica 505 U (Watson Marlow).

En los experimentos se usó agua para inyección o tampón fosfato, Na_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 8 mM, NaCl 140 mM pH 6.7. El microorganismo de prueba fue *Brevundimona diminuta* ATCC 19146, MicroBiologics CE, Lote 805323, Exp. 2005-10, Ref. 0805P. Autorizado por European Representative, MediMark® Europe.

Procesos de esterilización por calor húmedo en la preparación de los materiales para la filtración del IFA-HBsAg

Los procesos de esterilización por calor húmedo fueron en una autoclave horizontal DLOV (De Lama, Italia) a 130 °C durante 20 minutos. Se estudiaron dos cargas: la carga 1, en que se incluyen los filtros de membranas planas básicamente, y la carga 2, donde se esterilizan los materiales auxiliares (sifones, tuberías, puntas de pipetas, botellones, uniones, tapas, retapas, etc.) (Figura 2).

Para determinar la efectividad del ciclo de esterilización, se estudió la distribución de calor en la cámara de la autoclave, utilizando un sistema de validación térmica, Validator 2000 (Kaye Instruments Inc., EE.UU.), y se ubicaron 10 sensores de temperatura de alta precisión por toda la cámara (Figura 1).

Los valores de F_0 se calcularon según la ecuación [5]:

$$F_0 = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\left(\frac{t-121.1}{10}\right)} dt$$

Donde:

t_0 : es la temperatura inicial.

t_f : la temperatura final.

t : la temperatura de calentamiento específica para un determinado tiempo [5, 6].

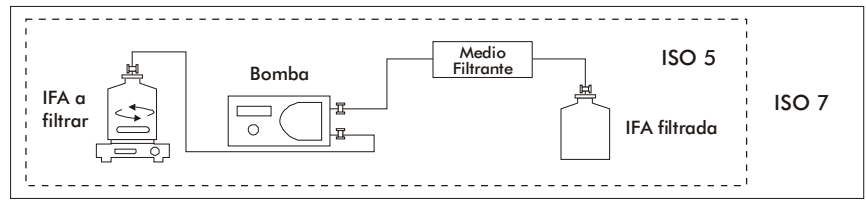


Figura 1. Esquema del sistema de filtración esterilizante del IFA-HBsAg.

Simulación del proceso de filtración esterilizante

Después de esterilizados y ensamblados los elementos del sistema, este se retó con un medio rico para el crecimiento microbiológico de caldo de triptona de soya (CTS), preparado a 30 g/L y con un volumen similar al proceso industrial, bombeado a través de todo el sistema de filtración. La prueba resultó satisfactoria cuando el caldo colectado cumplió el criterio de esterilidad según la Farmacopea de los EE.UU. (USP), USP XXX.

Promoción de crecimiento

Se evaluó la promoción de crecimiento microbiano del CTS preparado para cada ensayo de esterilidad. Se inocularon *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404, a razón de 0.1 mL del inóculo, con menos de 1000 UFC/mL del microorganismo. La viabilidad del inóculo se confirmó por siembra de los microorganismos en placas de agar triptona de soya. Los materiales se incubaron entre 30 y 35 °C: las bacterias durante 24 h, y los hongos, durante 48 h, para luego contar las UFC/placa. Hubo crecimiento microbiano y presencia de turbiedad.

Determinación de integridad para los medios filtrantes

La integridad del medio filtrante, la membrana o cápsula, antes y después de la filtración, por un método no destructivo, se determinó por el cálculo de su punto de burbuja. El límite para este valor puede determinarse por la correlación entre los datos de integridad medidos para el medio filtrante humedecido con producto, y el mínimo físico para el medio humedecido con agua, según la ecuación [3]:

$$P.B._{\text{prod. min.}} = P.B._{\text{agua min.}} \left(\frac{P.B._{\text{prod. prom.}}}{P.B._{\text{agua prom.}}} \right)$$

Donde:

$P.B._{\text{prod. min.}}$: es el punto de burbuja mínimo para el producto.

$P.B._{\text{agua min.}}$: el punto de burbuja mínimo para membranas humedecidas con agua.

$P.B._{\text{prod. prom.}}$: el punto de burbuja promedio determinado para el producto después de la filtración.

$P.B._{\text{agua prom.}}$: el punto de burbuja promedio para membranas humedecida con agua.

El rango de trabajo para el punto de burbuja debe establecerse entre el valor mínimo determinado para el producto y 1000 mBar por encima de este [3].

Análisis de extractables

Las pruebas se hicieron con el método de extracción con solvente [5]. Se colocaron tres medios filtrantes de

5. United State Pharmacopeia XXX-NF 25. <88> Pruebas de reactividad biológica, *in vivo*. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD; 2007:124-8.

6. United State Pharmacopeia XXX-NF 25. <71> Pruebas de esterilidad. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD; 2007:105-11.

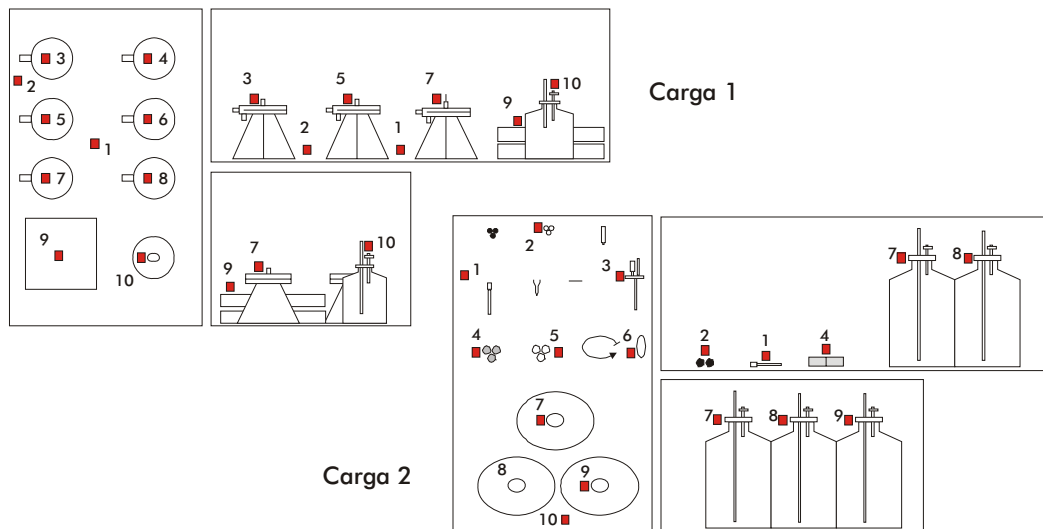


Figura 2. Distribución de los termopares en la cámara de la autoclave horizontal DLOV para los esquemas de carga, en la esterilización de los materiales y filtros de tripode para la filtración esterilizante del IFA-HBsAg. Los cuadrados rojos indican su posicionamiento con el número del sensor.

cada tipo, membranas 113 y cápsulas Sartobran P, en recipientes con tampón fosfato, que cubrieran toda la superficie filtrante durante 2 horas, y se esterilizaron en autoclave con el mismo ciclo descrito para las cargas de materiales. Después de esterilizados, se mantuvieron ambos medios filtrantes a 70 °C durante 24 horas en contacto con tampón fosfato a razón de 6000 cm²/L, el cual se analizó cada 12 horas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (EITF) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (CLAR-FI). La EITF se hizo con un Nicolet IR200 (Thermo Electron Scientific Instrument Co., EE.UU.) con detección de reflexión total atenuada (ATR, del inglés, attenuated total reflection). Los barridos realizaron desde 4000 cm⁻¹ hasta 675 cm⁻¹, a 6.25 cm⁻¹/min, sobre una celda con una placa de cristal de Ge (germanio) a temperatura ambiente. Se colocaron 200 µL de las muestras líquidas o las membranas sólidas sobre el cristal de la celda para su medición. Los espectros se representaron en transmitancia, luego de corregidos de las contribuciones del H₂O y CO₂, utilizando el software EZ OMNIC (Thermo Electron Scientific Instrument Co., EE.UU.). La CLAR-FI, se realizó en una columna Uptishere 120 A, 5 µm ODB C18 (3.9 mm x 250 mm, INTERCHIM, Francia) en las siguientes condiciones: velocidad de flujo, $f_t = 1$ mL/min; fase móvil, AcN- H₂O 10:90 v/v a 35 °C, detección a 220 nm. La separación se efectuó por un gradiente AcN 10 a 90% en 60 minutos. Frente a un blanco de tampón fosfato, se compararon las señales obtenidas.

Reto microbiológico

Se identificó el microorganismo de reto por una prueba IFA, y luego se demostró el tamaño adecuado de las células y la no formación de agregados. Para ello, se tomaron 2 alícuotas de 2 mL aproximadamente, de la suspensión de células de *B. diminuta*, y se filtraron por membranas de 0.45 µm y 0.2 µm, respectivamente. Cada uno de los filtrados se inoculó en un tubo de cultivo que contenía 20 mL de CTS, e incubó entre 30 y 35 °C durante 5 días. Se observó la posible presencia

de turbiedad en los tubos, durante y al final de la incubación: indicativo de crecimiento por el paso del microorganismo por la membrana.

Los experimentos de reto se hicieron en una cabina de flujo laminar ISO 5, en días diferentes a tres lotes de cápsulas o membranas. Se adicionaron células de *B. diminuta* a 15 L de tampón fosfato (TF) e IFA-HBsAg para lograr una concentración de $\geq 10^7$ UFC/cm² sobre la superficie del medio filtrante. Después de agitada la mezcla durante 5 minutos, se realizó la filtración. Las pruebas se consideraron exitosas si el material filtrado pasaba satisfactoriamente el ensayo de esterilidad [6].

Resultados y discusión

Esterilización por calor húmedo de materiales para la filtración del IFA-HBsAg

La primera operación y uno de los principales elementos para una filtración esterilizante satisfactoria, es la correcta esterilización de los materiales. Para determinar la efectividad del ciclo de esterilización, se hizo un estudio de distribución de calor en la cámara de la autoclave con la distribución de los sensores de temperatura (Figura 1). Ambas cargas son necesarias para las operaciones con membranas. Sin embargo, para la operación con cápsulas, solo es necesaria la carga 2, pues estos medios filtrantes son paquetes independientes, estériles y listos para su uso. Los resultados de la esterilización de las cargas 1 y 2, definidas en la figura 2, se presentan en las figuras 3 y 4.

Para la carga 1, el perfil del ciclo de esterilización es el característico para cargas sólidas, con una primera etapa de precalentamiento por inyección de vapor saturado, a razón de 200 kg/h, hasta desplazar, por venteo, todo el aire frío de la cámara; y otra de esterilización, hasta completar el tiempo definido, en aproximadamente 35 minutos, que termina con una etapa de enfriamiento, hasta que se pueden retirar los materiales esterilizados y preparar el siguiente ciclo (Figura 2, izquierda). Los valores de F_0 medidos por 10 sensores de temperatura distribuidos en el interior de la cámara

7. Boca BM, Pretorius E, Gochin R, Chapoullie R, Apostolides Z. An overview of the validation approach for moist heat sterilization, Part I. Pharm Techn 2002; 4:62-70.

8. Boca BM, Pretorius E, Gochin R, Chapoullie R, Apostolides Z. An Overview of the Validation Approach for Moist Heat Sterilization, Part II. Pharm Techn 2002; 2:96-110.

9. United State Pharmacopeia XXX-NF 25. <1211> Esterilidad y garantía de esterilidad de artículos farmacéuticos. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD;2007:736-42.

ra, sobrepasaron los 15 minutos a 121.1 °C, y se consideraron apropiados para un proceso de esterilización con vapor saturado (Figura 3, derecha) [7-9].

Para la carga 2: materiales auxiliares para la filtración esterilizante del IFA-HBsAg, el perfil del ciclo de esterilización es el característico para cargas porosas, en que el calentamiento inicial combina con varios ciclos de prevacío para hacer más efectiva la penetración del vapor saturado en el interior de los materiales por esterilizar (Figura 4, izquierda). Similar al ciclo anterior, este se caracteriza por una primera etapa de precalentamiento de la cámara por inyección de vapor saturado a razón de 200 kg/h, y otra etapa, de esterilización, hasta completar el tiempo definido en aproximadamente 25 minutos, que termina con una etapa de enfriamiento, hasta que se pueden retirar los materiales esterilizados y preparar el siguiente ciclo. Todos los valores de F_0 medidos por 10 sensores de temperatura distribuidos en el interior de la cámara, sobrepasan los 15 minutos a 121.1°C considerados como satisfactorios para un proceso de esterilización con vapor saturado (Figura 4, derecha) [7, 8].

Para ambos ciclos, los valores de tiempo en los cuales se alcanza el F_0 , están muy por encima de los considerados necesarios para un ciclo de esterilización con vapor saturado (Figuras 3 y 4, derecha). Los parámetros físicos que gobiernan la eficiencia del ciclo de esterilización son el tiempo, la temperatura y la presión. Estos dos últimos varían proporcionalmente en relación directa uno con el otro. Por ello, se acepta un rango de temperatura para la esterilización entre 118 y 134 °C. La USP declara un ciclo de autoclave, donde se especifiquen los materiales, medios o reactivos, por un periodo de 15 minutos a 121 °C [9]. Sin embargo, la Pharmacopeia Europea (EP) y la Británica (BP) recomiendan un proceso de calentamiento a 121 °C como mínimo, durante 15 minutos como una condición de referencia para preparaciones acuosas [10, 11]. Ambas Pharmacopeias dejan claro que se pueden utilizar otras condiciones de tiempo y temperatura, aunque el índice de letalidad se debe demostrar de forma adecuada y reproducible. El procedimiento matemático, también conocido como Anglo-Saxon, para el cálculo del índice de letalidad, usa el valor de F_0 como unidad de referencia. El valor de F_0 se puede calcular por la ecuación 1, que mostrará datos de temperatura que se acumulan a lo largo del proceso de esterilización, que se convierten a un equivalente de letalidad a 121.1 °C [7, 8].

Se ha demostrado que valores de F_0 de al menos 8 minutos, equivalentes a diferentes temperaturas de esterilización, alcanzan un índice de letalidad máximo [7, 8]. En nuestro estudio, y para ambos ciclos de esterilización, los valores de F_0 son superiores a los 15 minutos, alcanzados en algunos sitios específicos de la cámara, en dependencia de la carga y la colocación del termopar, valores que superan hasta tres veces los considerados ideales. Estos resultados indican la eficiencia de los ciclos de esterilización, al menos para estas dos cargas, que si bien dan potencialidad, no garantizan la esterilidad, pues la manipulación posterior de los materiales, puede impedir la en el proceso de filtración *per se*.

Para el proceso de filtración que usa cápsulas listas para su uso, no es necesario el ciclo de esterilización para la carga 1. Esto significa, que además de disminuir

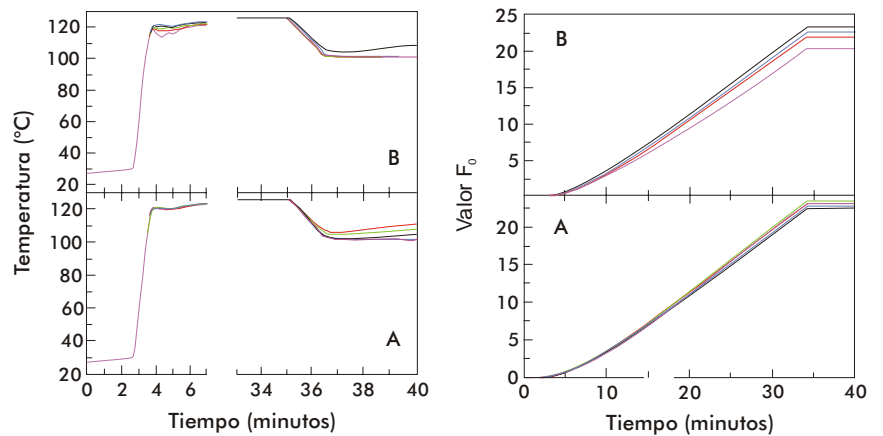


Figura 3. Estudio de distribución de calor para la Carga 1, filtros de membranas planas, en la filtración esterilizante del IFA-HBsAg. A la izquierda, perfiles de temperatura para los 10 sensores de temperatura distribuidos en la cámara de la autoclave según Figura 2; a la derecha valores de F_0 calculados según la ecuación 1. Los colores indican la posición de los sensores: en A (—) sensor 1; (—) sensor 2; (—) sensor 3; (—) sensor 4 y (—) sensor 5. En B (—) sensor 6; (—) sensor 7; (—) sensor 8; (—) sensor 9 y (—) sensor 10.

la manipulación del medio filtrante, lo cual simplifica la operación, disminuyen las causas de una posible contaminación después de ensamblado el sistema de filtración.

Simulación de la filtración esterilizante

El objetivo de esta prueba es demostrar si el ensamblaje del sistema, bajo flujo laminar ISO 5, no imposibilita la esterilidad de los materiales previamente preparados en autoclave. Esta prueba se realiza con todos los elementos del sistema de filtración (Figura 1), utilizando 15 L de CTS. Los resultados demuestran que en las simulaciones por los operadores específicos de la etapa, el medio de cultivo estéril conserva la capacidad de promover crecimiento, además de mantener su esterilidad después de haber fluido por todo el sistema en un intervalo similar al esperado para el procesamiento industrial: de 30 a 60 minutos (Tabla 1).

Aunque esta prueba no está contenida en ningún documento regulador, aporta datos importantes sobre

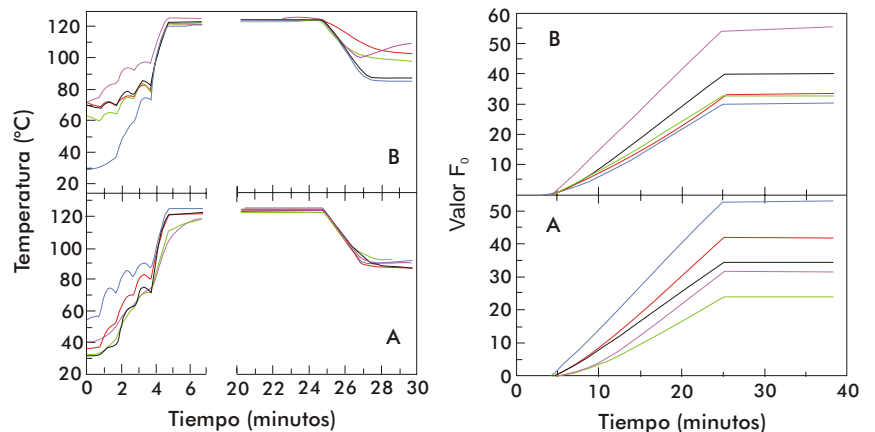


Figura 4. Estudio de distribución de calor para la Carga 2, materiales auxiliares, en la filtración esterilizante del IFA-HBsAg. A la izquierda, perfiles de temperatura para los 10 sensores de temperatura en la cámara de la autoclave según la Figura 1. A la derecha valores de F_0 calculados según la ecuación 1. Los colores indican la posición de los sensores: en A (—) sensor 1; (—) sensor 2; (—) sensor 3; (—) sensor 4 y (—) sensor 5. En B (—) sensor 6; (—) sensor 7; (—) sensor 8; (—) sensor 9 y (—) sensor 10.

Tabla 1. Resultados de promoción de crecimiento y de esterilidad de tres lotes de simulación de la filtración esterilizante

Lote	Operarios	Promoción de crecimiento*	Esterilidad
1	1 - 2	PP	PP
2	2 - 4	PP	PP
3	3 - 4	PP	PP
4	4 - 3	PP	PP

*La promoción de crecimiento se le realizó al medio de cultivo esterilizado.

PP: pasa la prueba.

la correcta manipulación del sistema durante el procesamiento aséptico: esterilización por autoclave y ensamblaje de sus componentes. El empleo del medio filtrante no es imprescindible, debido fundamentalmente al reto específico de este, con *B. diminuta* en correspondencia con las regulaciones vigentes (ver más adelante) [1-4].

Determinación de integridad de medios filtrantes la integridad de los medios filtrantes S y M del reto microbiolanas tipo 113 y ceste punto son similares

Tal como se estableció en la metodología experimental, se determinaron los puntos de burbuja como prueba de integridad para las membranas y cápsulas, con el objetivo de establecer un criterio que pueda constituir un parámetro de aceptación de la prueba que se realiza en todas las operaciones de filtración (Tabla 2).

Según las especificaciones del fabricante, el punto de burbuja mínimo para las membranas 113 debe ser mayor de 4200 mBar, y entre 3200 y 4200 mBar para las cápsulas Sartobran P. Ello constituye un punto de partida para establecer la especificación del trabajo en las condiciones de operación específicas [12]. Para tres muestras de los medios filtrantes con tres replicas y utilizando la ecuación 2, se calculó un punto de burbuja mínimo para el IFA-HBsAg de 3665 ± 56 mBar cuando se utilicen membranas, y 3094 ± 126 mBar para cápsulas. Por lo tanto, como criterio de aceptación para demostrar la integridad de ambos medios filtrantes, se estableció un rango de trabajo entre 3600 y 4600 mBar, y entre 2900 y 3900 mBar, para membranas y cápsulas, respectivamente, después del proceso de filtración esterilizante.

Aunque en la práctica el punto de burbuja mínimo está establecido por el fabricante para un medio filtrante humedecido con agua, las exigencias reguladoras indican establecerlo en las condiciones reales de operación, antes y después de su uso, como garantía de seguridad [1-4]. En más de 200 lotes productivos, donde la filtración esterilizante del IFA-HBsAg se ha hecho con membranas, se reportan valores de 4588 ± 162 mBar y 3935 ± 217 mBar para el punto de burbuja antes y después del proceso de filtración esterilizante. Para nueve procesos de esterilización con cápsulas, se obtuvieron valores de 3616 ± 114 mBar y 3274 ± 55 antes y después de filtrar, respectivamente. Según nuestros resultados, la relación de puntos de burbuja antes y después de filtrar es cercana al 90%, lo que indica la predecible influencia del tampón fosfato y la concentración del IFA-HBsAg sobre el tamaño del poro del medio filtrante [1, 3]. Como el punto de burbuja presumiblemente representa el poro de mayor tamaño presente en el medio filtrante, su valor no es

Tabla 2. Determinación del punto de burbuja para medios filtrantes utilizados en la filtración esterilizante del IFA-HBsAg

Muestra ^a	Membranas 113				
	P. B _{agua min} mBar	P. B _{agua prom} mBar	P. B _{IFA prom} mBar	P. B _{IFA min} mBar	Crit. acept. ^b mBar
1		4583 ± 72	3905 ± 25		
2	4290	4315 ± 22	3740 ± 10	3665 ± 56	3600 - 4600
3		4497 ± 38	3797 ± 15		
Promedio		4465 ± 126	3814 ± 74		
Cápsulas Sartobran P					
1		3610 ± 229	3267 ± 6		
2	3410	3590 ± 115	3250 ± 17	3094 ± 126	2900 - 3900
3		3630 ± 167	3293 ± 21		
Promedio		3610 ± 154	3270 ± 23		

P. B_{agua min}: punto de burbuja mínimo alcanzado por los medios filtrantes humedecidos con agua.

P. B_{agua prom}: punto de burbuja promedio para medios filtrantes humedecidos con agua.

P. B_{IFA prom}: punto de burbuja promedio para medios filtrantes después de la filtración.

P. B_{IFA min}: punto de burbuja mínimo determinado para el IFA-HBsAg según ecuación 2.

^a Todas las muestras se midieron por triplicado.

^b Crit. acept.: criterio de aceptación establecido para la prueba.

absoluto. Ello, unido a la influencia sobre el medio filtrante, las características intrínsecas del material que se desea filtrar, la concentración de las proteínas, la viscosidad y la composición del tampón fosfato, hacen que sean razonables varianzas de punto de burbuja entre el 10 y el 15% para un proceso de filtración específico, lo cual se verifica en nuestro estudio [1, 13].

Los resultados anteriores demuestran cómo los procedimientos de preparación, esterilización y uso de los medios filtrantes, garantizan la estabilidad física y química durante todo el proceso de filtración. Esta prueba de determinación de integridad, además de cumplir las exigencias reguladoras vigentes, indica que específicamente para el proceso de filtración esterilizante del IFA-HBsAg pueden utilizarse cualquiera de los dos medios estudiados, pues los resultados son similares [1-3].

Análisis de extractables

Para la operación de extracción, se simuló un caso peor, pues los sistemas de filtración después de esterilizados tardan no más de seis horas para ser utilizados, además de la hora del proceso de filtración *per se*, siempre operado a temperatura ambiente. El análisis de extractable por EITF se facilita conociendo la contribución espectral inicial de los materiales de construcción de los medios filtrantes sin tratamiento alguno (Figura 5, señal 1 izquierda y derecha). Varios picos intensos a longitudes de onda de 1045 cm^{-1} , 1120 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} y 1740 cm^{-1} , indican los diferentes grupos químicos funcionales que caracterizan la estructura particular para membranas y cápsulas [12]. Ninguno de los medios filtrantes tiene una contribución espectral significativa entre los 2000 y 4000 cm^{-1} , excepto la de grupos -OH de la humedad ambiental después de los 3000 cm^{-1} (datos no mostrados). Es preciso destacar que los espectros para ambos medios filtrantes son prácticamente idénticos, debido a la similitud estructural en su composición química [12].

Al humedecer los medios filtrantes con tampón fosfato a temperatura ambiente durante 20 minutos, aparece una nueva contribución espectral a 1670 cm^{-1} ,

10. British Pharmacopeia 2007. Appendix XVIII Methods of sterilization (Methods of preparation of sterile products). The Stationary Office, London; 2007.

11. European Pharmacopeia. Council of Europe, Strasbourg, 5th ed.; 2005:283-5.

12. Sartorius Microfilters. Product Overview [monografía online]. URL: http://www.sartorius.com/BRO-Microfilters_SM-1503-e.pdf [7 enero 2008].

13. Jornitz MW, Agalloco JP, Akers RE, Madsen RE, Meltzer TH. Filter Integrity testing in liquid Application, revisited, Part 1. Pharm Techn. 2001; October 2:34-50.

que se adiciona a las ya observadas (Figura 5, señal 2 izquierda y derecha). Estos espectros sirven como referencia para identificar alguna contribución contaminante que pueda aparecer en el material filtrado.

Los espectros del TF e IFA-HBsAg se caracterizan por un pico ancho con un máximo a los 1670 cm^{-1} cuyo posicionamiento no se corresponde con los grupos funcionales presentes en los medios filtrantes (Figura 5, señales 3 y 4 izquierda y derecha). Este pico se mantiene prácticamente invariable, sin la aparición de otros, durante las 24 horas que se conservaron a 70°C después de esterilizados (datos no mostrados).

Lo más significativo de este estudio, es el resultado de la sustracción de los espectros obtenidos para el TF, blanco, y los correspondientes al IFA-HBsAg filtrado (Figura 5, espectro 5 izquierda y derecha) y al tampón fosfato, a diferentes tiempos de contacto con el medio filtrante después del tratamiento (Figura 5, espectro 6 izquierda y derecha). La ausencia de pico alguno en estos espectros, con umbral superior al 0.05% de transmitancia, indica que los medios filtrantes no aportan sustancias contaminantes que puedan interferir la calidad del material filtrado en las condiciones específicas de la filtración esterilizante del IFA-HBsAg, incluso para una situación de peor caso, en que las condiciones de extracción fueron a razón de $6000\text{ cm}^2/\text{L}$, a pesar de que las condiciones reales del proceso son 8.7 y $333.3\text{ cm}^2/\text{L}$ por volumen de IFA filtrado, para membranas 113 y cápsulas Sartobran P, respectivamente. Tanto el procedimiento de extracción en este estudio, como los espectros infrarrojos mostrados en la Figura 5, son muy similares a los reportados por el fabricante para las cápsulas Sartobran P en contacto con agua, independientemente del método para la medición [14].

Igualmente se estudió el tampón en contacto con los medios filtrantes por CLAR-FI (Figura 6). Las señales obtenidas para el blanco y el tampón, en contacto con la membrana a diferentes tiempos de conservación a 70°C , están a niveles de miliunidades de absorbancia (mUA), equivalentes al ruido propio del detector con pequeñas derivas en el tiempo de corrida. Nuevamente esto indica que no son detectables los componentes de los medios filtrantes, que no pudieron ser comparadas con la señal del IFA-HBsAg, debido a la interacción irreversible del material biológico con la fase estacionaria de la columna cromatográfica [15]. No obstante, considerando que esas señales están a niveles del límite de detección del detector, y conociendo las condiciones de extracción, se pueden conseguir niveles de extractables menores a 10 ppm para ambos medios filtrantes.

Durante la demostración de la idoneidad de un medio filtrante para una aplicación particular, se debe considerar el conocimiento de la probabilidad de generar sustancias extractables que puedan ser introducidas en la corriente de procesamiento durante la filtración [1-4]. En correspondencia con lo exigido por organizaciones reguladoras, se han propuesto diferentes pruebas y lineamientos que se deben considerar para la evaluación de sustancias extractables de plásticos, incluso la Pharmacopeia Americana (USP) propone una metodología de extracción para evaluar sustancias extractables en plásticos y las posibles técnicas analíticas para su evaluación, que destaca que un único método de análisis no es suficiente para dar un resulta-

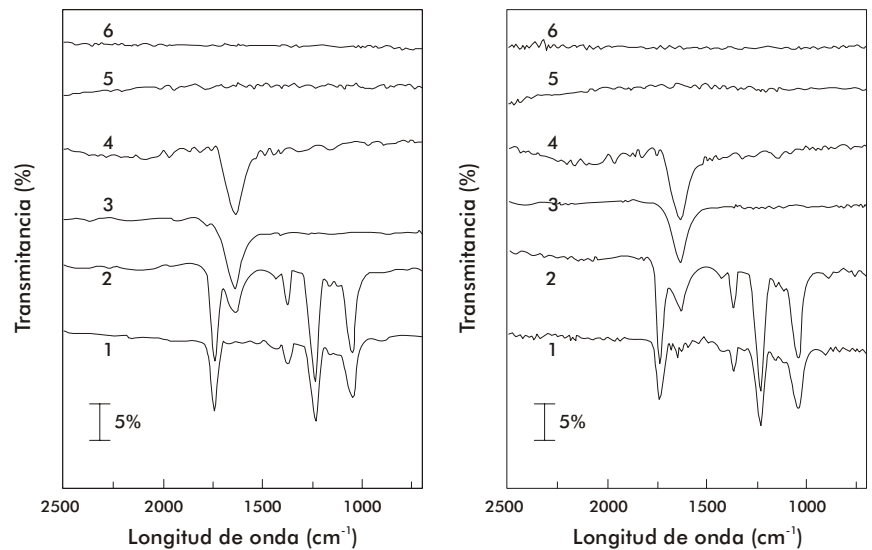


Figura 5. Evaluación de sustancias extractables para membranas, izquierda y cápsulas, derecha, por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. A la izquierda se representan los espectros para las membranas 113; 1) membrana seca tomada directamente de su envase; 2) membrana húmeda y esterilizada según se describió; 3) tampón fosfato esterilizado en autoclave; 4) IFA-HBsAg filtrado; 5) diferencia espectral entre el tampón fosfato e IFA-HBsAg filtrado y 6) diferencia espectral entre las señales del tampón fosfato, blanco, y tampón fosfato mantenido en contacto con la membrana 24 horas a 70°C . A la derecha, para las cápsulas Sartobran P: 1) membrana seca, 2) membrana humedecida en tampón fosfato; 3) tampón fosfato esterilizado en autoclave; 4) IFA-HBsAg filtrado; 5) diferencia espectral entre las señales del tampón fosfato, blanco, e IFA-HBsAg filtrado y 6) diferencia espectral entre las señales del tampón fosfato, blanco, y tampón fosfato en contacto con la membrana durante 24 horas a 70°C .

do fiable, por la complejidad de las sustancias individuales que se han de identificar [16-19]. En este estudio empleamos dos de las técnicas más recomendadas por su alto nivel de identificación, EITF y detección CLAR-FI, y los resultados demostraron la ausencia de sustancias extractables de los medios filtrantes, al no haber señales que así lo indicaran. Es muy importante asegurar que el medio filtrante no libere componentes que puedan contaminar el material filtrado, lo cual se debe demostrar independientemente de las consideraciones de los fabricantes, aun conociendo el bajo nivel de sustancias extractables para muchos de los sistemas filtrantes disponibles hoy, incluidos los que se utilizan en la producción del IFA-HBsAg [12]. La evaluación en las condiciones específicas de operación, aporta información valiosa sobre el desempeño del sistema.

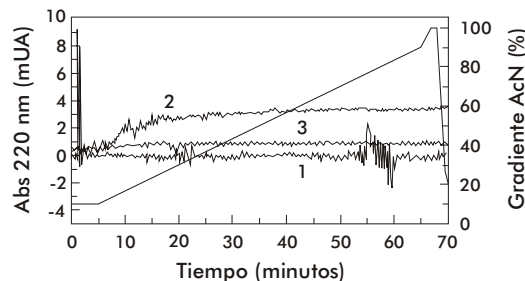


Figura 6. Perfiles cromatográficos durante el análisis de extractable para los medios filtrantes en la filtración esterilizante del IFA-HBsAg. Las señales corresponden a 1) tampón fosfato, blanco, 2) tampón fosfato en contacto con la membrana 113 y 3) tampón fosfato con contacto con membrana de Cápsula Sartobran P. Las señales 2 y 3 se recogieron luego de mantener a ambos medios filtrantes a 70°C durante 24 horas: después de esterilizados por calor húmedo.

14. Sartorius AG. Sartobran P[®]. Extractables Analysis. Publication No. SPK 5720-e02062; 2002.

15. Tleugabulova D, Falcón V, Sewer M, Pentón E. Aggregation of re-combinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *J. Chromat B* 1998;716:209-19.

16. Yu X, Wood D, Ding X. Extractable and leachables study approach for disposables material used in bioprocessing. Two case studies illustrate a systematic approach. *Biopharm* 2008; February 1:42-8.

17. Bennis J, Bing F, Boone H, Fernández J, Seely H, van Deinste H. Evaluation of extractable from product-contact surfaces. *Biopharm* 2002; December 3:22-34.

Reto microbiológico

Caracterización del microorganismo

Antes del experimento de reto, se identificó el microorganismo *B. diminuta* ATCC 19146 con una viabilidad de 6×10^{10} UFC/mL, y pureza en correspondencia con el estándar definido, mediante un ensayo tipo IFA, que resultó positivo para *Brevundimonas* (Figura 7). Además, se demostró que no había agregación por filtración en membranas de 0.45 μm y 0.2 μm , respectivamente, y solo hubo crecimiento y turbidez en el caldo inoculado con el filtrado procedente de la membrana de 0.45 μm . Estos resultados demuestran que el diámetro de las células era superior a 0.2 μm e inferior a 0.45 μm , lo que responde a los criterios de selección del microorganismo [1-3].

Comprobación de la integridad de las membranas antes de la filtración por determinación del punto de burbuja

La determinación del punto de burbuja como método no destructivo para comprobar la integridad de las membranas filtrantes, se recomienda antes de las pruebas de reto microbiológico [1-3] (Tabla 3).

La preparación de los filtros fue satisfactoria: los valores de punto de burbuja estuvieron dentro de los rangos definidos para la operación específica, en función del tipo de membrana utilizado (acápito 3.3).

Pruebas de retención bacteriana

Las pruebas de retención bacteriana se realizaron en días diferentes, y se retaron TF e IFA contaminados, según se describe en la metodología experimental. La esterilidad del material filtrado fue satisfactoria al no haber contaminación, lo cual demostró la efectividad de ambos medios filtrantes para retener una alta carga microbiológica, y esterilizar efluentes, en las condiciones de operación en el proceso de obtención del IFA para la vacuna cubana antihepatitis B (Tabla 4).

Estos resultados demuestran la garantía de esterilidad del proceso de filtración del IFA-HBsAg con ambos medios filtrantes. Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico y regulador, la reducción del tiempo de procesamiento, por eliminación de un ciclo de esterilización, la reducción de la manipulación previa al proceso de filtración y el tiempo de operación *per se*, hacen más atractiva la filtración por cápsula Sartobran P.

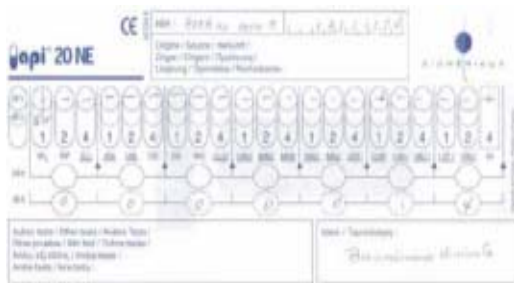


Figura 7. Identificación bioquímica del microorganismo *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146 en el estudio de reto de membranas 113 y cápsulas Sartobran P.

Recibido en diciembre de 2008. Aprobado en junio de 2009.

Tabla 3. Determinación de los puntos de burbuja para las membranas en la prueba de reto microbiológico

Material contaminado	Punto de burbuja mBar		Resultado
	Membranas 113	Cápsulas Sartobran P	
TF ^a	4458 ± 149	3620 ± 62	Prueba positiva
IFA ^b	4480 ± 79	3705 ± 33	Prueba positiva

^a TF: tampón fosfato.

^b IFA: ingrediente farmacéutico activo.

Tabla 4. Resultados del reto microbiológico a medios filtrantes en la filtración esterilizante del IFA-HBsAg

Medio filtrante	Material contaminado	Conc. Inoc. ^a /10 ⁹ u.f.c. ^b /mL	Conc. Botell. ^c /10 ⁶ u.f.c./mL	Conc. membr. ^d /10 ⁻⁷ u.f.c./cm ²	Ensayo de esterilidad
Membrana 113	TF ^e	5.7 ± 1.9	3.8 ± 1.3	4.5 ± 1.5	Pasa el ensayo
	IFA ^f	6.8 ± 2.4	13.3 ± 4.6	5.3 ± 1.8	Pasa el ensayo
Cápsula Sartobran P	TF	6.6 ± 0.2	1.7 ± 0.5	5.3 ± 0.2	Pasa el ensayo
	IFA	6.7 ± 0.6	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.5	Pasa el ensayo

^a Conc. Inoc.: concentración del inóculo.

^b u.f.c.: unidades formadoras de colonia.

^c Conc. Botell.: concentración en el botellón.

^d Conc. membr.: concentración en la membrana.

^e TF: tampón fosfato.

^f IFA: ingrediente farmacéutico activo.

Otros parámetros de la operación

Los resultados de este trabajo responden cuestiones importantes para un proceso de filtración. La compatibilidad química de los medios filtrantes quedó demostrada durante las mediciones de los puntos de burbuja antes y después del proceso de filtración. El cumplimiento del criterio de aceptación para esta prueba indicó que ambos medios filtrantes no sufren alteración en su estructura por la interacción con la corriente de proceso. Otro elemento importante es el porcentaje de recobro en términos HBsAg, que se mantiene por encima del 99% en más de 200 lotes producidos hasta hoy, lo que indica una baja adsorción de proteínas a los medios de filtración soportados sobre una correcta selección de los parámetros de operación, una presión aproximada de 1 bar, una temperatura de 22 ± 2 °C, una fuerza iónica del tampón fosfato de 16 ± 3 mS/cm y una concentración de HBsAg, de 1 mg/mL aproximadamente.

Conclusiones

Cualquier productor de IFA, independientemente de las consideraciones de los fabricantes, debe cumplir las numerosas regulaciones que validan los procesos asepticos por filtración [1-4]. En la filtración esterilizante del IFA-HBsAg, con membranas 113 y cápsulas Sartobran P (Sartorius, Alemania), demostramos que 1) los procesos de esterilización por calor húmedo, para las cargas definidas, alcanzaron valores de F_0 superiores a los 15 minutos, lo que indicó una correcta esterilización, 2) es seguro el ensamblaje de los elementos del sistema por los operadores, 3) ambos medios filtrantes permanecen íntegros, antes y después del proceso de filtración, 4) no hubo sustancias extractables que pudieran incorporarse a la corriente del proceso, y que 5) ambos medios filtrantes pueden retener la contaminación bacteriana en condiciones reales del proceso. Estos resultados demuestran que la operación de filtración esterilizante del IFA-HBsAg, es segura.

18. Weitzmann CJ. The use of model solvent for evaluating extractable from filters used to process pharmaceutical products, part 1. Practical considerations. Biopharm 1997; April 6: 44-59.

19. Weitzmann CJ. The use of model solvent for evaluating extractable from filters used to process pharmaceutical products, part 2. Assigning a model solvent. Biopharm 1997; April 6: 72-9.