

Comunicación Técnica

Aplicación del concepto de espacio de diseño en el desarrollo de biofármacos

Space Design during the development of biopharmaceuticals

Raúl Soria Osorio^{1,2}, Angélica Meneses-Acosta², Jorge F. Paniagua Solis¹

¹Laboratorios Silanes, S.A. de C.V.

²Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Resumen

El desarrollo de procesos biofarmacéuticos está presentando una transición dada la gran cantidad de regulaciones y la amplitud de aplicaciones generadas por la biotecnología. Por ello, la introducción del concepto de espacio de diseño en el desarrollo de biofármacos, ha tomado una mayor importancia en los últimos años después que la Conferencia Internacional de Harmonización publicó en 2009 la segunda versión de la guía ICH Q8(R2) que contiene las bases generales de este concepto. Esta guía proporciona las directivas generales para la elaboración de los reportes de las etapas de desarrollo farmacéutico promoviendo. Entre los fabricantes de biofármacos la inclusión de estudios extensivos del principio activo, del medicamento y del proceso de manufactura basados en un análisis de riesgo para asegurar la calidad de los productos de una manera sistematizada.

Abstract

The development of the biopharmaceuticals processes is showing transition due to a great amount of regulations and to the extent of applications generated by the biotechnology. Hence, the introduction of the design space concept in the biopharmaceuticals development has brought a greater significance in the last few years after the International Conference of Harmonization issued in 2009, the second version of the ICH Q8 (R2) Guide that contains the concept general specifications. This Guide provides current directives for the elaboration of the pharmaceutical development stages reports in order to promote, among the biopharmaceuticals manufacturers, the inclusion of comprehensive studies for drug substance, drug product and manufacturing process based on a risk analysis in order to assure the products quality in a systematized basis.

Palabras clave: espacio de diseño, biofármaco, armonización. **Keywords:** space design, biopharmaceuticals, harmonisation.

Correspondencia

Raúl Soria Osorio
Amores 427, Col. Del Valle Centro, CP.03100, México, D.F.
Tel. 5488 3700 Ext. 3788
Fax 5488 3700
e-mail: rsoria@silanes.com.mx

Fecha de recepción: 22 de octubre de 2010
Fecha de recepción de modificación: 28 de enero de 2011
Fecha de aceptación: 10 de marzo de 2011

Introducción

Definición de espacio de diseño

El espacio de diseño de un biofármaco se puede definir como la combinación multidimensional y la interacción de las variables de entrada (e.g. líneas celulares, materia prima) y los parámetros de proceso para demostrar el cumplimiento de los atributos de calidad de un proceso.¹ El concepto de espacio de diseño se incluye en varios aspectos del desarrollo y manufactura de biofármacos, como son la etapa de caracterización, optimización, validación, manufactura comercial y registro sanitario.²

La regulación actual de biofármacos demanda procesos de producción robustos con un elevado nivel de aseguramiento de la calidad, lo que ha incrementado notablemente la complejidad de los procesos, los mecanismos de evaluación y la aprobación de los productos generados por estos procesos. En este sentido, la aplicación del espacio de diseño proporciona una herramienta que permite simplificar y sobre todo brindar la capacidad de resolver eventualidades durante el proceso de desarrollo de nuevos biofármacos.²

Etapas del espacio de diseño

El espacio de diseño consta de 3 etapas principalmente. La primera etapa consiste en la determinación de los efectos de la variabilidad de las especificaciones de calidad y del desempeño del proceso a partir del conocimiento adquirido en las etapas de investigación básica, experiencia clínica y de otros productos similares previamente desarrollados. La segunda etapa consiste en los estudios de caracterización y el establecimiento de los intervalos de aceptación para cada uno de los parámetros críticos del proceso. Finalmente, la última etapa consiste en la evaluación y el análisis de la interacción de los parámetros críticos de proceso para determinar los intervalos de aceptación que garanticen la calidad del producto.^{2,3}

Estas etapas permiten establecer el espacio de diseño que delimita los intervalos de operación, control y alerta de cada uno de los parámetros del proceso. (Figura 1).

Primera etapa: estudios de variabilidad

Es común que la etapa de investigación básica permita identificar los parámetros de proceso y los atributos de calidad del producto que son la base de los estudios de caracterización. También, es común que los procesos biotecnológicos tengan una elevada complejidad debido a las múltiples variables (temperatura, presión, dO_2 , etc) que intervienen en cada una de las operaciones unitarias que componen el proceso, sobre todo en las etapas que involucran el uso de sistemas biológicos (4). Por lo que es necesario el uso de análisis multivariantes (MVDA) y diseño de experimentos (DoE) para determinar las respuestas de desempeño del proceso, identificación de las interacciones entre parámetros y la definición de los intervalos de

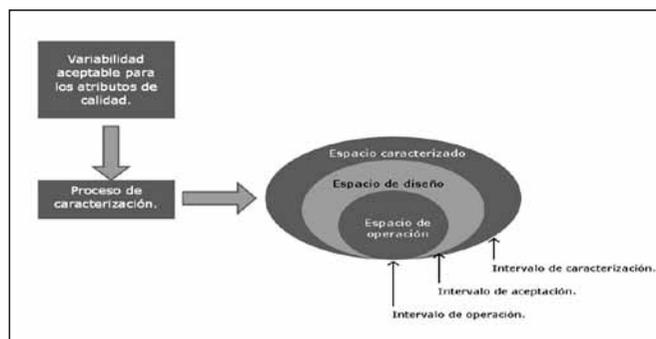


Figura 1. Establecimiento del espacio de diseño para procesos biotecnológicos.

Modificado a partir de la US Food and Drug Administration, **Guidance for industry: Q8 (R2) Pharmaceutical Development**, Rockville, MD; Nov, 2009.

operación y aceptación.² Otra herramienta que es indispensable en esta etapa es el análisis de riesgo para la evaluación del grado de confiabilidad y seguridad del proceso para generar satisfactoriamente las especificaciones de calidad del producto.

Segunda etapa: proceso de caracterización

La etapa de caracterización es una de las etapas más importantes, debido a que proporciona la información que será utilizada en etapas posteriores. Esta etapa consta de 3 secciones: la primera consiste en un análisis de riesgo del proceso para la evaluación e identificación de los parámetros críticos de proceso que se evaluarán en el proceso de caracterización, la segunda es el uso del diseño de experimentos (DoE) para el establecimiento de los estudios de caracterización, y finalmente la ejecución y análisis de los datos generados para el establecimiento del espacio de diseño.

En la Figura 2 se presenta un ejemplo de un diseño experimental en la que se muestran los efectos combinados de los parámetros que intervienen en el proceso y que fueron utilizados para el establecimiento del espacio de diseño.³

Tercera etapa: evaluación y el análisis de la interacción de los parámetros críticos de proceso (CPPs)

Esta etapa permite realizar la evaluación de los resultados obtenidos en la etapa anterior, para poder determinar los intervalos de operación, control y alerta para cada uno de los parámetros críticos de proceso (CPPs) evaluados. Aquí es importante considerar los datos históricos del desempeño del proceso y hacer una evaluación del riesgo para estimar si los intervalos de operación permiten garantizar el cumplimiento de los atributos de calidad del producto. En algunas ocasiones es necesario generar lotes de prueba para evaluar el espacio de diseño mediante el monitoreo exhaustivo de los atributos de calidad del producto en proceso y producto terminado, además

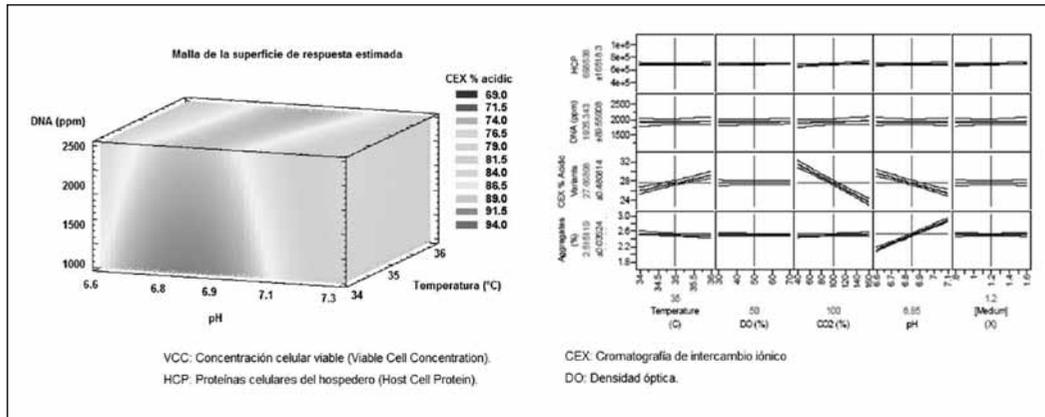


Figura 2. Resultados de diseño experimental multifactorial (DOE) para un proceso de reacción enzimática. Resultados experimentales parciales de Laboratorios Silanes S.A. de C.V.

de estudios de estabilidad. Estos análisis permiten generar la evidencia de la compatibilidad del espacio de diseño.²

El concepto de espacio de diseño en el proceso de validación

Una de las definiciones más aceptadas de validación es la colección y evaluación de datos científicos que proporcionan evidencia de que el proceso genera productos que cumplen consistentemente con las especificaciones de calidad predeterminadas.² A partir de este concepto, el espacio de diseño juega un papel fundamental en la validación de procesos biotecnológicos pues incrementa el conocimiento sobre los atributos críticos del producto, los parámetros de proceso y la identificación de los intervalos de operación durante la manufactura rutinaria, los cuales se utilizan como base para los criterios de aceptación en el proceso de validación. La aplicación del espacio de diseño en la validación demuestra que la operación del proceso dentro del espacio de diseño genera un producto que cumple con la calidad predeterminada y

que la escala piloto empleada para determinar el espacio de diseño es aplicable y compatible con la escala de producción comercial.³ Lo que permite obtener la evidencia documental de la consistencia, control y reproducibilidad del proceso (Figura 3).

Evaluación del espacio de diseño post-aprobación

Durante la producción a escala comercial es necesario el monitoreo y evaluación de los atributos de calidad de los productos y de los parámetros de operación del proceso para asegurar el cumplimiento del espacio de diseño y por tanto, determinar el cumplimiento de las especificaciones de calidad del producto, por lo que es importante establecer las metodologías y estrategias de colección y análisis de datos de proceso. Para cumplir este objetivo se emplean herramientas como el control

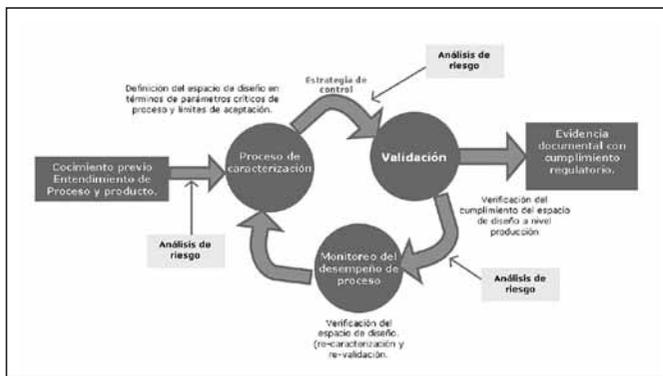


Figura 3. Establecimiento del espacio de diseño y la estrategia final de control.

Modificado de Rathore, Branning, Cecchini, Elements of Biopharmaceutical Production Series, BioPharm.

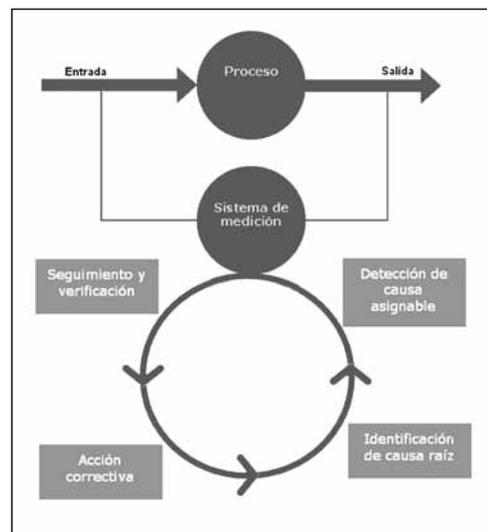


Figura 4. Monitoreo de procesos a partir del control estadístico de proceso.

estadístico de procesos (CEP) que permiten determinar el desempeño de proceso con evaluaciones puntuales de cada una de los componentes del proceso. El diseño óptimo de sistemas de medición y evaluación de datos de proceso permite determinar posibles irregularidades en el proceso, identificar la causa raíz y poder generar una acción correctiva para que de esta manera, se tenga un control efectivo del proceso.⁵ (Figura 4).

En el siguiente caso de estudio se plantea el establecimiento del espacio de diseño para la producción de una proteína recombinante (X1), a partir de datos generados en etapas previas del desarrollo.

Resultados

Caso de estudio: establecimiento del espacio de diseño para la producción de una proteína recombinante (X1)

La primera etapa consiste en un análisis de riesgo a partir del conocimiento obtenido en la etapa de investigación básica para la producción de la proteína recombinante de interés. En la Tabla 1 se presentan los resultados de este análisis inicial, en el cual se identifica solo la etapa de expansión del microorganismo recombinante con un elevado riesgo sobre la calidad del producto, sin embargo, todas las etapas tienen un alto riesgo de impactar sobre el desempeño del proceso. Este análisis se realizó a partir de los datos experimentales en las primeras etapas de desarrollo.

Adicionalmente se utilizaron los resultados experimentales de otras proteínas recombinantes (X2, X3 y X4) desarrolladas anteriormente. Lo que permitió realizar un análisis de los

Tabla 1. Análisis de riesgo inicial del proceso de producción de la proteína recombinante X1.

Etapa de proceso	Riesgo de impacto en los atributos de calidad del producto	Riesgo de impacto sobre el desempeño del proceso
Etapa de producción de inóculo en contenedores desechables.	Bajo	Alto
Expansión del microorganismo recombinante.	Alto	Alto
Producción del biofármaco.	Medio	Alto
Cosecha: filtración de flujo tangencial.	Bajo	Alto
Purificación final.	Medio	Alto

** Resultados experimentales.

parámetros de proceso en la etapa de producción del biofármaco para establecer los intervalos de operación preliminares utilizados en diferentes escalas de producción (Tabla 2), que permitió reducir significativamente el número de experimentos y los costos y tiempos de desarrollo.

Tabla 2. Experiencia previa del proceso de expansión del microorganismo recombinante.

Producto	Parámetro de desempeño	Producción de biofármacos (Expansión celular y expresión).		
		Matraz agitado de 0.25L	Biorreactor desechable de 2.5 L	Biorreactor agitado de 250L
X1	Tasa de crecimiento específico.	0.55 ± 0.10 días ⁻¹	0.60 ± 0.08 días ⁻¹	0.62 ± 0.10 días ⁻¹
	% de viabilidad del término del cultivo.	92 ± 7	90 ± 9	95 ± 5
	Expresión de la proteína recombinante.	120 ± 1.3 mg/L de medio	125 ± 2.67 mg/L de medio	120 ± 3.3 mg/L de medio
X2	Tasa de crecimiento específico.	0.40 ± 0.12 días ⁻¹	0.38 ± 0.10 días ⁻¹	0.45 ± 0.09 días ⁻¹
	% de viabilidad del término del cultivo.	90 ± 7	91 ± 6	94 ± 5
	Expresión de la proteína recombinante.	119 ± 0.9 mg/L de medio	122 ± 3.24 mg/L de medio	124 ± 4.3 mg/L de medio
X3	Tasa de crecimiento específico.	0.65 ± 0.15 días ⁻¹	0.66 ± 0.13 días ⁻¹	0.72 ± 0.11 días ⁻¹
	% de viabilidad del término del cultivo.	89 ± 09	90 ± 8	93 ± 6
	Expresión de la proteína recombinante.	122 ± 2.1 mg/L de medio	132 ± 1.67 mg/L de medio	117 ± 2.3 mg/L de medio
X4	Tasa de crecimiento específico.	0.62 ± 0.10 días ⁻¹	0.59 ± 0.14 días ⁻¹	0.62 ± 0.14 días ⁻¹
	% de viabilidad del término del cultivo.	95 ± 8	90 ± 8	94 ± 3
	Expresión de la proteína recombinante.	127 ± 2.9 mg/L de medio	118 ± 4.24 mg/L de medio	120 ± 1.3 mg/L de medio

** Resultados experimentales.

Con base a estos parámetros de operación preliminares se demostró que la etapa de expansión del cultivo celular es un proceso robusto y reproducible en diferentes escalas de operación y configuraciones de biorreactores. Los resultados que se presentan en la Tabla 2 muestran que no existe una diferencia significativa en la tasa de crecimiento específico, porcentaje de viabilidad celular y expresión del biofármaco para las 4 proteínas recombinantes (X1, X2, X3 y X4) y en las tres escalas de producción evaluadas (0.25, 25 y 250 L). A partir de estos resultados se puede demostrar la aplicabilidad del espacio de diseño obtenido a partir de otros procesos similares y de datos de etapas preliminares de desarrollo.

En la Tabla 3, se presentan los parámetros críticos de proceso para las dos etapas de producción (2.5L y 25L) identificados como Proceso A y Proceso B respectivamente, en las que se observa que los intervalos de operación preliminares son aplicables y compatibles en ambas escalas de producción. De la misma manera en la Tabla 4 se presentan los intervalos de operación para los CPPs los cuales fueron estimados y diseñados a partir de los datos generados en las primeras etapas de investigación y en los procesos

Tabla 3. Parámetros de operación en dos biorreactores nivel producción.

Parámetros	Proceso A	Proceso B	Base para el cambio
Escala	2.5L	25 L (Fase 3) 250 L (lotes comerciales)	Incremento de la escala de operación.
Temperatura	30°C	30°C	No cambio
Oxígeno disuelto (OD)	25%	28%	Incremento de la concentración para asegurar la disponibilidad de la misma concentración.
pH	7.0	7.0	No cambió
Duración del cultivo.	3 a 5 días	5 a 7 días	Para alcanzar la densidad óptica requerida en el reactor de producción.
Concentración basal del medio.	1.0 X	1.2 X	Para alcanzar la densidad óptica requerida en el reactor de producción.

Tabla 4. Intervalos de operación durante la etapa de expansión y expresión de biofármaco durante dos escalas del proceso de producción.

Parámetro	Unidades	Proceso A	Proceso B
Concentración de inóculo	vc / mL	2.5 a 6.0 x 10 ⁵	2.1 a 4.5 x 10 ⁵
pH	pH	6.8 a 7.2	6.9 a 7.2
Oxígeno disuelto	%	20 a 35	25 a 40
Temperatura de proceso	°C	29.9 a 30.1	28.8 a 29.9
Densidad celular	vc / mL	2.8 a 4.5 x 10 ⁶	3.2 a 5.1 x 10 ⁶
Viabilidad de pase	Hrs.	92-95	91 a 94

vc/mL: células viables por mililitro.

de escalamiento. La aplicación de esta metodología permite estimar de manera preliminar el impacto de la variabilidad de los CPPs sobre los atributos de calidad; lo que permite establecer los límites de operación que serán utilizados en la etapa de evaluación y análisis de la interacción de los parámetros críticos de proceso a partir del uso de herramientas como el diseño experimental, análisis de riesgo o calidad por diseño. Es fácil visualizar la simplificación del proceso de caracterización de tal forma que se disminuye el número de ensayos debido a que se tiene una idea preliminar del intervalo que puede ser ajustado después de la caracterización final.

Como se mencionó anteriormente, estos intervalos de operación (Tabla 4) fueron la base para realizar un diseño experimental (DoE), para la etapa de expansión en la que sólo se evaluaron los CPPs (pH, oxígeno disuelto y temperatura) debido a que el resto de los parámetros no tienen un efecto significativo en el desempeño del proceso ni en la calidad del producto según los datos preliminares.

Se realizó un estudio de diseño experimental para obtener datos que permitan un mejor entendimiento del proceso de producción de la proteína recombinante X1, un análisis factorial DoE realizado en biorreactores de 2.5 L evaluando el pH, OD, temperatura, concentración celular viable (VCC por sus siglas en ingles), viabilidad y duración del cultivo. Las muestras obtenidas de este estudio fueron evaluadas para analizar algunos parámetros de calidad del producto; Fucosa, agregados, componentes de bajo peso molecular y proteínas del hospedero (HCP por sus siglas en ingles). En la Tabla 5 se presentan los resultados de este estudio, donde se reportan los valores *p* de una análisis estadístico (T-test) de los datos. A partir de estos resultados se determina que ninguno de los parámetros

Tabla 5. Resultados de estudios DoE realizados en el biorreactor de 2.5L.

Parámetros de proceso	Valores-P							
	Desempeño de biorreactor			Productividad de biorreactor	Calidad de producto			
Variables (niveles)	VCC	Viabilidad	Duración de cultivo	Título de cosecha	Fucosa	Agregados	Componentes de bajo peso molecular	HCP
pH	0.003	0.24	0.04	0.001	0.28	0.54	0.34	0.26
Oxígeno disuelto	0.31	0.25	0.15	0.36	0.77	0.78	0.37	0.49
Temperatura	0.03	0.005	0.003	0.04	0.67	0.45	0.38	0.59
pH + oxígeno disuelto	0.002	0.45	0.43	0.56	0.76	0.94	0.45	0.36
pH + temperatura	0.45	0.76	0.89	0.04	0.67	0.98	0.76	0.58
dO + Temperatura	0.28	0.34	0.65	0.59	0.63	0.56	0.98	0.34

de operación tiene un impacto sobre la calidad del producto, y solo la temperatura y el pH tienen un impacto sobre los atributos de proceso VCC, viabilidad y duración del cultivo (en negritas en la Tabla 5).

Para este caso de estudio la información preliminar y los resultados del proceso de caracterización y el análisis de riesgo, demostraron la robustez del proceso de expansión sobre diferentes escalas de producción (Tabla 6). Lo que permitió determinar de manera simplificada que los intervalos de operación para los

parámetros de proceso preestablecidos generan un producto que cumple con las especificaciones de calidad del producto por lo tanto el espacio de diseño es apropiado para esta etapa.

Conclusiones

La regulación internacional incluyó recientemente el concepto de espacio de diseño que permite determinar la relación entre las variables del proceso (atributos de materias primas y parámetros de proceso) y los atributos críticos de calidad. En algunos casos es evidente que la implementación de este concepto permite disminuir los tiempos de desarrollo y optimización de nuevos productos mediante el uso de toda la información obtenida en las etapas de investigación y desarrollo preliminares. Eventualmente el uso del espacio de diseño ha proporcionado la simplificación del proceso de aprobación sanitaria de nuevos productos.

Referencias

1. Rathore, Branning, Cecchini, 2009. Elements of Biopharmaceutical Production Series, BioPharm.
2. US Food and Drug Administration. Nov 2009. Guidance for Industry, Q8(R2) Pharmaceutical development. Rockville, MD.
3. Anurag Singh, Gail Sofer. 2005. Process validation in manufacturing of biopharmaceuticals. Taylor and Francis, pp 254-311.

Tabla 6. Intervalos de operación durante la etapa de expansión y expresión de biofarmaco para el proceso final (nivel producción).

Parámetro	Unidades	Intervalo de operación	Intervalo de alerta
Concentración de inóculo	vc / mL	2.5 a 4.0 x 10 ⁵	2.0 a 6.5 x 10 ⁵
pH	pH	6.9 a 7.0	6.8 a 7.2
Oxígeno disuelto	%	25 a 35	20 a 40
Temperatura de proceso	°C	29.9 a 30.1	28.5 a 30.5
Densidad celular	vc /mL	3.5 a 4.5 x 10 ⁶	3.2 a 5.2 x 10 ⁶
Viabilidad de pase	Hrs.	92-94	90 a 96

4. US Food and Drug Administration. June de 2006. Guidance for Industry Q9 Quality risk management, Rockville, MD.
5. US Food and Drug Administration, center for drug evaluation and research center for veterinary Medicine, Office of regulatory Affairs. September 2004. PAT guidance for industry a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance, Rockville, MD.
6. US Food and Drug Administration. May 2006. Guidance for Industry, Q8 Pharmaceutical development. Rockville, MD.
7. Belter, E.L. Clussler, W. S. Hu, 1988. Bioseparations: Downstream processing for biotechnology, J. Wiley, NY, U.S., pp. 23-59.
8. Peterson, J. J. 2008A Bayesian approach to the ICH Q8 Definition of design space. J Biopharm statistics.