INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Matemáticas y Física

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

PROGRAMA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

PAP4I02 Nanotecnología con Impacto en la Industria

Desarrollo de pruebas para validación de insulina humana en PiSA Biotec, Guadalajara, Jalisco

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología Orlando Uri Bravo Oropeza

Profesor PAP: Dr. Carlos Zepeda Sahagún

Tlaquepaque, Jalisco, noviembre de 2018

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP 2

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional 2

Resumen 2

1. Introducción 3

1.1. Objetivos 3

1.2. Justificación 3

1.3 Antecedentes 3

1.4. Contexto 4

2. Desarrollo 5

2.1. Sustento teórico y metodológico 5

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto 6

3. Resultados del trabajo profesional 8

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto 8

5. Conclusiones 12

6. Bibliografía 12

Anexos (en caso de ser necesarios) 13

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

Se realizaron pruebas para establecer los parámetros que servirán para la determinación del contenido e identidad de insulina humana, y sus conservadores, en preparaciones farmacéuticas de producto. La metodología se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con columnas cromatográficas, empleando como fases móviles soluciones de acetonitrilo y buffer de sulfato de sodio y flujo adecuado para su funcionamiento. Se obtuvo un método en el que se logró reducir el tiempo de los ensayos a solo minutos para la detección de los analitos de interés, con criterios de aceptación adecuado. También, se establecieron los volúmenes de inyección y las diluciones más adecuadas para esta finalidad. Este proyecto servirá para desarrollo el Protocolo de Validación del Método Analítico por HPLC para estos productos.

1. Introducción

1.1. Objetivos

El objetivo de este PAP es la elaboración de un protocolo para describir el procedimiento, las responsabilidades y los criterios de aceptación en el que se soportará la validación del método analítico para determinar el contenido e identidad de insulina humana recombinante, contenido de fenol y de metacresol en producto semiterminado y terminado. La validación del método analítico se realizará de acuerdo con una modificación en la metodología de Insulina humana Preparaciones de Inyectable descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 11ª edición y en la Farmacopea Británica (BP, por sus siglas en inglés) 2018 (Farmacopea Británica, 2017; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014).

1.2. Justificación

Mediante este PAP se logra obtener un acercamiento a la industria farmacéutica nacional y al proceso regulatorio que rige la producción y distribución de medicamentos de origen biotecnológico. Hay una necesidad por producir medicamentos de alta calidad, con garantía de su seguridad y alta eficacia. Esto así por la naturaleza de los productos que se destinan a mejorar la calidad de vida de la sociedad que padece enfermedades, que pueden ser tratadas para disminuir se severidad o para la preservación de la vida. Es por eso que es necesario asegurar la calidad durante cada etapa del proceso y minimizar el margen de error en los análisis que se realizan para este propósito.

1.3 Antecedentes

PiSA Biotec es una empresa mexicana perteneciente al Grupo PiSA, que se enfoca en el área de la biotecnología, que cuenta con profesionistas dedicados al desarrollo de biomedicamentos para terapias personalizadas y donde se fabrican medicamentos de esta naturaleza como la insulina. Este Grupo de empresas nace en 1945 como Productos Infantiles S.A. (PiSA) por iniciativa de Miguel Álvarez Ochoa en conjunto con profesionales de la salud, para satisfacer una necesidad presente de contar con medicamentos que

estuvieron diseñados y formulados para los infantes en el país. Esta empresa comenzó produciendo alrededor de diez medicamentos distintos para tratar afecciones típicas en los niños como gotas para tratar los cólicos de los bebés, gotas analgésicas y jarabes para tratar la tos. Debido a la buena aceptación de estos medicamentos por parte de la sociedad, y supervisión personal del fundador Álvarez Ochoa en el proceso, la empresa destacó en la calidad de materias primas y materiales utilizados para la fabricación de estos.

Más adelante, gracias al sólido crecimiento obtenido por el esfuerzo, trabajo y conocimientos de los colaboradores de la empresa, en 1955 se transforma en Laboratorios PiSA S.A. de C.V. En la actualidad, la confianza obtenida por parte de la población por la alta calidad en la elaboración de productos de muy alta calidad y el cumplimiento con las normas nacionales e internacionales regulatorias en la producción farmacéutica, se cuenta con más de 18,000 empleados y 10 plantas de manufactura, 18 unidades de negocio, 11 cruces de andén y 5 almacenes presentes en todo el territorio mexicanos y en algunos países de América Latina. Las empresas de este grupo son PiSA farmacéutica, PyMPSA, AMSA laboratorios, PiSA agropecuaria, SAFE, Galia, Sanefro, Dimesa, Medicom, Farmacias La Paz, Bodylogic, PiSA BioPharm, Divirosa, Cab Logistics, Translima y Corporativo CAB, además de PiSA Biotec.

1.4. Contexto

El proyecto se llevó a cabo en el departamento de Desarrollo Analítico Biotecnológicos en la planta Biotecnológicos, ubicada en la Calle 6 de la colonia Colón Industrial en Guadalajara, Jalisco. La responsable de este proyecto fue la QFB. Elvira Alfaro Herrera, Coordinadora de Desarrollo Analítico, bajo la supervisión del Dr. William Alfonso Rodríguez Limas, Gerente de Biotecnológicos. Se realizaron las pruebas del proyecto en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, con el propósito de actualizar el método analítico para normalizar las preparaciones de insulina para cada lote del biofármaco. Esto se debe a una modificación en la metodología de Insulina humana Preparaciones de Inyectable descritas

en la FEUM 11° edición y en la BP del 2018, con la finalidad de contar con una metodología analítica que sea adecuada y específica para garantizar un resultado exacto, preciso, reproducible y rápido.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

Se describen las normas de referencia que se tomaron como base para el desarrollo del proyecto y las herramientas empleadas para llevarlo a cabo en el laboratorio.

Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) PiSA

Se consultaron algunos documentos en los que se define la forma de trabajo establecida para el área de cromatografía en el laboratorio de desarrollo analítico y los análisis obtenidos de estos. Contienen las instrucciones requeridas para llevar a cabo una operación de manera reproducible. Además, detalla las instrucciones para los registros en el proceso de verificación y permite establecer un sistema documental del trabajo realizado.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)

La FEUM es el documento instituido por la Ley General de Salud, expedido y reconocido por la Secretaría de Salud, donde se establecen las metodologías generales de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza y calidad que garantice que los medicamentos, fármacos, productos biológicos, aditivos y dispositivos médicos sean funcionales, eficaces y seguros según las características del país (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014).

Farmacopea Británica (BP)

La BP dicta las normas oficiales para sustancias farmacéuticas y productos medicinales en el Reino Unido, al igual que en casi 100 países adicionales, y sirve para fijar estándares de cumplimiento farmacéutico. Incluye casi 4,000 monografías que se hacen cumplir de

manera legal por el Human Medicines Regulations e involucra la investigación, desarrollo, fabricación, control de calidad y análisis dentro de la industria farmacéutica (Farmacopea Británica, 2017; Secretary of State and the Minister for Health, Social Services and Public Safety, 2014).

Módulo de Separaciones Cromatográficas Alliance e2695

Este equipo cromatográfico es una plataforma que integra el manejo de solventes y muestras para su análisis. Con la integración de estos dos elementos fue posible realizar la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC, por sus siglas en inglés) y facilitó la separación de los elementos críticos. Al equipo se montaron dos columnas para cromatografía durante el análisis, una que serviría como la principal y otra como la alterna al método a desarrollar. De esta manera, los analitos se distribuyen entre la fase móvil polar y la fase estacionaria no polar, separándose por la diferencia en la velocidad a la que eluyen debido a su preferencia entre estas dos fases (Esquivel-Soto & Leal-Guadarrama, 2004).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

  Debido a la demanda de biotecnológicos en el país y con el enfoque de crear competitividad se desarrollan nuevos productos que ayudan a satisfacer las necesidades específicas en este ramo. Uno de estos productos es la molécula insulina, la cual es de gran importancia médica debido a los elevados casos de diabetes que se presentan en todos los estratos y categorías de la población.

  Esta insulina humana difiere de las insulinas provenientes de origen animal, porque es estructuralmente idéntica a la insulina producida por el páncreas humano y porque su proceso de manufactura es único. La insulina humana es una hormona peptídica de dos cadenas que consiste en 51 aminoácidos y su estructura corresponde a la insulina nativa producida *in vivo* por las células beta del páncreas.

La cadena A está compuesta de 21 aminoácidos y la cadena B está compuesta por 30 aminoácidos, las cuales se encuentran unidas entre sí por medio de dos puentes disulfuro. Estas insulinas humanas analizadas son producidas por métodos basados en tecnología de ADN recombinante o derivado por modificación enzimática de insulina del páncreas porcino para cambiar la secuencia de aminoácidos de manera apropiada (Yilmaz & Kadioglu, 2010).

Por lo tanto, se realizaron pruebas mediante HPLC fase reversa para determinar la concentración de insulina humana, y sus conservadores, presentes en sus diferentes preparaciones para venta. Uno de los propósitos era disminuir el tiempo de las corridas del análisis, ya que como problemas principales para este fin estaban los largos tiempos de retención de entre 25 y 40 minutos para detectar la insulina de los productos (Asahara, Yamada, & Yoshida, 1991; Sato, Tsuji, Hirai, & Kang, 1990). Esto se considera como algo excesivo cuando, por ejemplo, en el departamento de Control de Calidad, es necesario analizar un gran número de muestras continuamente. Es por eso que en el presente método se utilizaron fases móviles de una composición determinada y un tiempo rápido en las corridas de 15 minutos, que sería adecuado para el análisis de grandes cantidades de muestras.

- Plan de trabajo

Para realizar el proyecto fue necesario seguir un proceso de aprendizaje respecto al uso del equipo para el análisis en cromatografía de las insulinas y, por lo tanto, previo al inicio se apoyó a otros colaboradores del laboratorio y se revisó en la literatura varias condiciones de experimentación. En la figura 1 se muestra el cronograma de actividades seguido para el logro del objetivo del proyecto.

Tabla I. Cronograma de actividades realizadas

Actividad	Semanas														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Documentación para ingreso a planta															
Inducción e introducción a laboratorio															
Fundamentos de cromatografía y PNO's															
Preparación de soluciones de lavado y fases móviles															
Guía de validación de métodos analíticos por QFB's															
Inicia experimento con columna principal															
Experimentación con flujos para el análisis															
Revisión de resultados y ajuste de estrategia															
Experimento con flujos y volumen de inyección															
Experimento con diluciones de insulina P.T.															
Experimentación con soluciones de referencia y P.T.															
Inicia experimento con columna alterna															
Experimentación con soluciones de referencia y P.T.															
Limpieza de equipo Alliance y revisión de resultados															

3. Resultados del trabajo profesional

Con los resultados que se obtuvieron a partir de las pruebas realizadas a las muestras de insulina, se logró determinar que la columna principal a usar para el Protocolo de Validación del Método Analítico por HPLC para Identidad, Contenido de Insulina, Fenol, y Metacresol en Insulina Humana producto Semiterminado y Terminado es la propuesta en un inicio. Por consiguiente, la columna alterna se evaluó y aceptó su utilización. También, se lograron disminuir los tiempos de retención de los analitos a cuantificar a menos de 15 minutos para columnas de esta longitud. De igual manera, se determinó cual fue el mejor flujo para los análisis, un volumen de inyección con mejores resultados y las diluciones más adecuadas a utilizar para el desarrollo del método de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Mi estancia en la empresa me permitió desarrollar mi capacidad de pensamiento crítico, analítico y creativo para generar ideas alrededor de una problemática técnica del proceso. Me ayudó a mejorar mi capacidad de comunicar los problemas a que me enfrentaba de una manera más eficaz, mediante una metodología y un orden en el desarrollo de los experimentos. El nivel de detalle y de control que se debe manejar para este tipo de productos farmacéuticos hizo indispensable que participara dentro de un equipo de trabajo con especialistas en áreas particulares. De esta manera, fue posible ir construyendo una serie de experimentos con una mejor estructura y un mayor rigor al integrar los distintos conocimientos de cada integrante del laboratorio.

Estar involucrado en este proceso de producción me permitió darme cuenta de la relevancia que tienen los protocolos de validación en la industria farmacéutica. En lo económico, es evidente que este sector genera grandes utilidades con la comercialización de sus productos y también una gran cantidad de empleos. En cuanto al aspecto social y político, me di cuenta que los consumidores depositan su confianza en una empresa a la hora de adquirir cierto tipo de medicamentos y que entonces los gobiernos tienen la obligación de ejercer autoridad mediante normas para garantizar la seguridad y eficacia de estos productos.

El participar en este proyecto hizo necesario que aplicara y profundizara en mis aprendizajes obtenidos en las materias cursadas durante mi carrera. Se retomaron principios de microbiología, fisiología celular y biología molecular al participar en actividades de apoyo con los demás integrantes del laboratorio. También, se retomaron conocimientos de química analítica e ingeniería genética, que fueron los más destacados para el desarrollo de las pruebas para el método. Además, este proyecto no solo requirió que se repasaran estos aspectos mencionados, sino que fue necesario profundizar y comprender con mayor grado de detalle ciertos temas particulares de cada uno de estos. Es por esto que, durante mi estancia en la empresa, no llegué solamente a poner en

práctica los conocimientos que había adquirido durante la carrera, sino que fue un proceso de aprendizaje constante. Considero que esto contribuye en gran manera a mi desarrollo profesional, porque es indispensable adoptar una actitud y un deseo de aprendizaje continuo con el fin de aportar mejores propuestas de solución a problemas que se presenten.

- Aprendizajes sociales

Mi estancia en PiSA Biotec me dio una perspectiva clara de la industria farmacéutica mexicana y las oportunidades que tiene para la innovación y la mejora continua. Los proyectos que se desarrollan en el laboratorio persiguen el beneficio de la sociedad asegurando la calidad de los medicamentos que se ofrecen. Así mismo, el enfoque multidisciplinario permite un desarrollo integrador de propuestas para plantear soluciones a las problemáticas que van surgiendo. El proyecto permitió que profundizara en un área de los productos biológicos y en el uso de tecnologías vanguardistas que tiene un impacto positivo en los biofármacos, en procesos de producción industrial y en la medicina.

Las actividades que se realizaron para lograr los objetivos del proyecto fueron complejas ya que mi prioridad era comprender la relevancia de lo que tenía que hacer, respecto a cómo se lograba un beneficio inmediato para la sociedad. Una vez que comencé a entender el porqué de la experimentación que se estaba llevando a cabo, logré dimensionar la importancia de asegurar el medicamento y cumplir con la normativa correspondiente. Considero que esta experiencia enriqueció mi proceso para la toma de decisiones es muy importante, debido que al tener la capacidad de plantear objetivos específicos reflejan los resultados de cada investigación o trabajo desarrollado para la mejora e innovación de medicamentos que van enfocados a la sociedad. Los conocimientos obtenidos a lo largo del desarrollo del método sumaron a mi formación profesional y me proporcionaron de una valiosa experiencia en cuanto a liderazgo, proactividad y empuje personal.

Considero que los aprendizajes obtenidos por este proyecto pueden ser aplicados a diversos ámbitos de mi formación personal y profesional. La toma de decisiones es una habilidad que muestra sus beneficios en cualquier actividad en la cual se aplique. De igual forma, todo lo aprendido respecto a la metodología que se siguió al seguir lo dictado por farmacopeas nacionales e internacionales es directamente aplicable en mi desempeño académico y profesional.

- Aprendizajes éticos

Con la oportunidad de haber participado en este proyecto en PiSA pude darme cuenta de la calidad de la industria farmacéutica mexicana y el nivel de compromiso que tienen los empresarios de este sector. Además, el vivir este proceso para la producción de biofármacos es sumamente compleja y en esta complejidad está el detalle hacia lo que se va a ofrecer a la sociedad. Proyectos de esta naturaleza están sometidos a escrutinio y deben tener un sustento firme en cuanto a la eficacia y a sus posibles consecuencias. Esta experiencia me invita a mejorar mi metodología de aprendizaje como estudiante y futuro profesionista, a manera de cuestionar y de entender a profundidad cada tema y actividad que se presente en mi carrera profesional y personal. Además, considero que esta misma actitud podré aplicarla como profesionista con el fin de proporcionar una opinión crítica, bien fundamentada y con una visión orientada al beneficio de mi comunidad.

- Aprendizajes en lo personal

La experiencia durante el proyecto de aplicación profesional y mi estancia en el laboratorio de PiSA Biotec me retaron para aplicar los aprendizajes obtenidos a lo largo de mi preparación académica. Un aspecto que puedo resaltar es que me permitió ser proactivo para generar propuestas de solución a los problemas que se iban presentando durante la ejecución de las pruebas. Esto fue importante para mí porque esta manera de abordar un problema iba acompañada con el compromiso de buscar respuestas y soluciones, que en muchas ocasiones requerían de la búsqueda de información exhaustiva y de manera consistente.

Al formar parte de un grupo de trabajo conformado por integrantes con diferentes áreas de especialidad y con fortalezas, así como experiencias, distintas a las mías, me hizo reconocer el valor y la riqueza que cada uno de nosotros aporta a un equipo de colaboradores. Fue así que logré desarrollar el proyecto de forma más completa y con elementos que aportaban a la resolución de los problemas que se iban presentando.

5. Conclusiones

En este proyecto se pudieron llevar a cabo una serie de pruebas que sirvieron para la elaboración del protocolo del método analítico para los productos de insulina, mediante la experimentación cambiando ciertos parámetros. Se establecieron velocidades de flujo del sistema, volumen adecuado de inyección de las muestras para obtener buena resolución en los cromatogramas, dilución necesaria de las muestras y proporciones de las soluciones buffer y solvente para cumplir los parámetros de aceptación del método. Posteriormente, con los resultados obtenidos será posible iniciar con el protocolo de la validación de manera formal, para que sea sometido a revisión por la empresa y realizar la transferencia al Departamento correspondiente.

6. Bibliografía

Asahara, K., Yamada, H., & Yoshida, S. (1991). Stability of human insulin in solutions containing sodium bisulfite. *Chem. Pharm. Bull.*, 377-387.

Esquivel-Soto, E. E., & Leal-Guadarrama, I. (2004). *Métodos fisicoquímicos en Biotecnología.* Cuernavaca: Instituto de Biotecnología.

Farmacopea Británica. (2017). Human Insulin.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2014). *Productos Biotecnológicos, Insulina Humana Recombinante* (Undécima ed.).

Sato, H., Tsuji, A., Hirai, K., & Kang, Y. (1990). Application of HPLC in disposition study of A14-125I-labeled insulin in mice. *Diabetes*, 563-569.

Secretary of State and the Minister for Health, Social Services and Public Safety. (2014). *The Human Medicines Regulations 2012.*

Yilmaz, B., & Kadioglu, Y. (2010). Development and validation of HPLC method for determination of human insulin in pharmaceutical preparation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 40-43.

Anexos (en caso de ser necesarios)