XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras

VALIDACIÓN PARCIAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR PARTÍCULAS ADENOVIRALES TOTALES POR HPLC

Irene Vergara Bahena, Angélica Meneses Acosta.
Facultad de Farmacia- Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. CP. 62010. angelica_meneses@uaem.mx.
Tel: (52) (777) 329 7000 ext. 3366

Adenovirus, HPLC, Terapia génica.

Introducción. La terapia génica (TG), es una alternativa que utiliza material genético específico para modificar las células, para reestablecer la función biológica de un gene defectuoso, o en otros casos, para sobreexpresar una proteína terapéutica con el fin de tratar diversas enfermedades[(1)]. Una forma de realizar esta modificación es utilizando partículas virales como vectores las cuales sean capaces de introducir el material genético en la célula. Así, el adenovirus ha sido un vector ampliamente utilizado debido a la obtención de altos títulos virales, su amplio tropismo y su alta capacidad de clonación[(2)]. Debido a su creciente aplicación en TG, un punto crítico es la cuantificación de los títulos virales obtenidos ya que esto es necesario para la formulación de las dosis correspondientes convirtiéndose en una necesidad el desarrollo de metodologías precisas, exactas y rápidas.

Por ello, en este trabajo se presenta la validación de un método para cuantificar partículas adenovirales totales por cromatografía de líquidos de alta resolución basado en la norma mexicana NOM-177-SSA1-1998.

Metodología. Se utilizó un detector UV-Vis marca Perkin-Elmer, y una columna de intercambio aniónico Uno-Q Polishing Anion Exchange (BioRad). Fase móvil: Solución de Hepes 0.25 M pH 7.5 y NaCl 2M pH 7.5. Se utilizó un estándar certificado de adenovirus tipo 5 (ATCC CR-1516). Se realizaron los ensayos correspondientes para definir la selectividad, eficiencia, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, reproducibilidad de acuerdo con la norma oficial NOM-177-SSA1-1998.

Resultados y discusión. El método de cuantificación fue parcialmente validado con base en los parámetros de desempeño que marca la Norma oficial. Se evaluó la selectividad, comparando los cromatogramas de un blanco, un estándar de referencia de adenovirus tipo 5 y una muestra problema. La linealidad se evaluó con el coeficiente de correlación obtenido por la inyección de diferentes concentraciones de virus (Figura 1), el cual fue de r^2=0.999, y cuyo valor mínimo permitido por la Norma es de r^2=0.98. Se determinó la precisión con el porcentaje del coeficiente de Variación (%CV) calculado a partir del promedio de las concentraciones recuperadas en tres niveles de concentración (alta, media y baja) cuyos valores fueron; 1.68, 1.97 y 1.21 respectivamente. Estos cumplen con la Norma Oficial al estar por debajo del 15%. Finalmente, la exactitud se evaluó con el Porcentaje de Desviación Absoluta (DA%) cuyos resultados para la concentración alta, media y baja (12, 12.5 y 13.5) fueron menores al 15%. También se determinaron los límites de detección (LD=3.47X10^9 PVT/mL) y cuantificación (LC=4.46X10^9 PVT/mL).

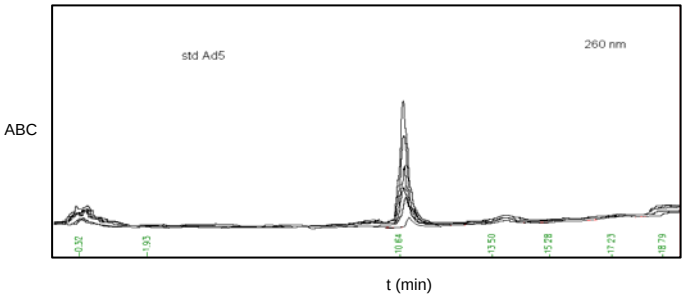

Fig. 1. Cromatogramas empalmados de la cuantificación de partículas adenovirales.

Conclusiones. Se logró la validación parcial del método analítico de cuantificación de partículas adenovirales totales por HPLC, bajo las condiciones de trabajo establecidas durante el análisis y con base en lo establecido por la NOM-177-SSA1-1998, ya que todos los parámetros obtenidos estuvieron dentro de la norma.

Agradecimientos. A la Facultad de Farmacia de la UAEM y a PROMEP-SEP.

Bibliografía.

1. Józkowicz A, Dulak J. 2005. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. Jagiellonian University, Kraków, Poland. *Acta Biochimica Polonica,* 52: 3: 589-599.
2. Kamen A, Henry O. 2004. Development and optimization of an adenovirus production process. *Journal Gene Medical.* 6: S184-S192.