



SEGURIDAD DE LOS BIOFÁRMACOS: USO DE LA QPCR PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INACTIVACIÓN/REMOCIÓN DE VIRUS ADVENTICIOS EN PROCESOS CROMATOGRÁFICOS DE PURIFICACIÓN

Sánchez-Ponce Adán, Canales-Aguirre Alejandro, Camacho-Ruiz Rosa, Mateos-Díaz Juan, Elizondo-Quiroga Darwin, Esquivel-Solís Hugo, Díaz-Martínez Emmanuel, Padilla-Camberos Eduardo, Márquez-Aguirre Ana Laura: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C Biotecnología Médica y Farmacéutica/ Biotecnología Industrial. Guadalajara, Jalisco, México.

Biofármacos, Remoción, qPCR

Introducción. Los virus modelo no específicos, son empleados en estudios en los cuales se pretende evaluar la robustez de un proceso de manufactura para la remoción y/o inactivación de virus adventicios. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) podría permitir evaluar la inactivación de las partículas virales en los procesos cromatográficos de purificación de biofármacos, las cuales no pueden ser cuantificadas mediante un ensayo de infectividad.

Evaluar el proceso cromatográfico de remoción y/o inactivación de virus adventicios en la manufactura de productos biofarmacéuticos mediante la técnica de qPCR.

Metodología. Cuatro virus modelo no específicos fueron seleccionados, *Parvovirus Porcino (PP)*, *virus de la Encefalomiocarditis (EMC)*, *Simian Virus 41 (SV41)* y *Virus del Herpes Humano simple (HVS-1)*, debido a sus características tanto físicas como fisicoquímicas.^(1,2) En un proceso cromatográfico escalado, cada virus es inoculado intencionalmente en un biofarmacéutico. Posteriormente se determina el factor de remoción y/o inactivación, a través de la cuantificación del número de genomas virales presentes en las fracciones obtenidas en las corridas mediante un ensayo de qPCR por medio de una curva de cuantificación absoluta construida con estándares de plásmidos recombinantes.

Resultados. Se obtuvieron cuatro plásmidos recombinantes para cada uno de los virus, los cuales fueron utilizados para la construcción de las curvas utilizadas para el ensayo de cuantificación absoluta. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos y sondas y a su vez la optimización de los mismos, determinando la concentración de oligonucleótido/sonda para cada reacción de qPCR y se estableció una relación 200/50 nM para SV41, mientras que para HVS-1 fue de 200/250 nM.

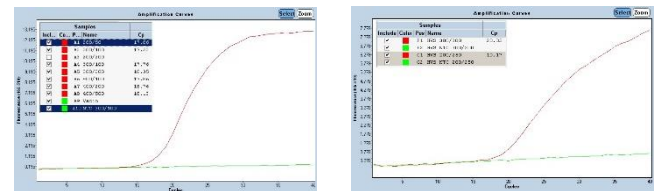


Fig. 1. Amplificación para el virus SV41 y PP respectivamente. Se determinó la concentración óptima de la mezcla oligonucleótido/sonda, de acuerdo al ciclo de amplificación y la fluorescencia emitida por la sonda durante la amplificación, utilizando el plásmido recombinante respectivo para cada uno de los virus como secuencia consenso.

Tabla 1. Matriz de concentraciones utilizadas para la optimización de la mezcla oligo/sonda HVS-1 y SV41.

HVS-1 Oligo/Sonda	Cp	ΔR	SV41 Oligo/Sonda	Cp	ΔR
200/50	19.54	2.158	200/50	17.86	20.0
200/100	19.77	2.520	200/100	17.52	14.091
200/250	19.17	7.778	200/200	18.58	21.226
300/100	19.70	2.681	300/100	17.76	15.697
300/200	19.78	6.679	300/200	18.35	27.504
300/250	20.04	7.426	400/100	17.86	14.779
300/300	20.05	6.282	400/200	18.76	27.193
			400/250	18.13	34.029

Conclusiones. El ensayo de qPCR es un método útil en la estimación de la inactivación de virus adventicios en los procesos de purificación de proteínas recombinantes por medio de cromatografía.

Agradecimiento. El presente trabajo ha sido realizado bajo financiamiento del proyecto "Evaluación de la eliminación y/o inactivación de virus en dos procesos de purificación de productos biofarmacéuticos" FONDO DE INNOVACIÓN 2013.

Bibliografía.

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of human or animal origin Q5A (R1)*. Current Step 4 version dated 23 September 1999.
2. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use. *Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products*. London, 24 July 2008.
3. Aranha H., Forbes S. *Viral Clearance Strategies for Biopharmaceutical Safety, Part II: A Multifaceted Approach to Process Validation*. Pharmaceutical Technology JUNE 2001.