

AJUSTE DE PARÁMETROS PARA EL ESTUDIO DEL RETO VIRAL EN LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL SURFACEN®

Y. Sánchez*, E. Noa *, Wilma Alfonso, Marta Dubed *, Giselle Álvarez*, Leonor Navea*, Nivian Montes de Oca**, Leonor Lobaina*, Elaine Díaz ****

**Laboratorio de Investigaciones del SIDA. LISIDA. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. San José de las Lajas. CP 32700. La Habana. Cuba. Correo electrónico: lisida@infomed.sld.cu, yorsanchez@infomed.sld.cu; **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: wilma@censa.edu.cu*

RESUMEN: La validación de la capacidad de aclaramiento viral de los procesos de producción de biológicos es necesaria para ofertar un producto con un adecuado nivel de seguridad y en su realización se deben ajustar las condiciones que permitan asegurar la precisión del estudio. El objetivo de este trabajo fue establecer el procedimiento de procesamiento de las muestras y demostrar la factibilidad de uso de los modelos virales en la validación del proceso de producción del SURFACEN®. Las muestras de las etapas del proceso de producción se diluyeron 1:5 y 1:10 en solución balanceada de sales, se realizaron diluciones seriadas y se seleccionó la dilución donde la citotoxicidad fuera moderada. Para determinar la interferencia se utilizaron cinco modelos virales que se diluyeron 1:10 en los lavados pulmonares, se tomó una muestra inicial y otra después de 1h. Se consideró que no había interferencia cuando la diferencia entre los títulos virales fue menor de 2 log. En la dilución 1:5 del estudio de citotoxicidad las células mostraron cambios ligeros a altos en la morfología, mientras en 1:10 fueron mínimos a moderados, por lo que se seleccionó esta dilución para procesar las muestras. Los títulos de los modelos virales en presencia de los lavados pulmonares disminuyeron en menos de 2 log sin diferencias significativas. Estos resultados permitieron establecer la metodología para procesar las muestras y demostró la factibilidad de utilizar estos modelos en los estudios de validación de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción del SURFACEN®.

(Palabras clave: SURFACEN®; validación viral; citotoxicidad; interferencia)

ADJUSTMENT OF PARAMETERS FOR THE STUDY OF VIRAL CHALLENGE IN THE VALIDATION OF SURFACEN® PRODUCTION PROCESS

ABSTRACT: Validation of viral clearance capacity in biological manufacturing process is necessary to offer a final product with an appropriated accuracy level and in this procedure should be adjusted the conditions that allow the precision of the study. The aim of this paper was to establish the procedure of processing samples and to demonstrate the feasibility of using viral models in validation of SURFACEN® production process. The samples of the production steps were diluted 1:5 and 1:10 in buffer solution. Serial dilution were made and it was selected the dilution which cytotoxicity was moderate. Five viral models were diluted 1:10 in pulmonary washes in order to determine the interference. It was taken an initial sample and a second one after one hour. None interference was consider when the difference between viral titles was less than 2 log. Morphology of cells showed from light to high changes in 1:5 dilution, whereas in 1:10 dilution variation was minimum to moderate during the cytotoxicity study. The last one dilution was selected to process the samples. The viral models titles in presence of pulmonary washes decrease lower than 2 log, without significant differences. These results allowed to establish the methodology for processing samples and showed the feasibility of viral models in the validation of viral clearance capacity of the SURFACEN® production process.

(Key works: SURFACEN®, viral validation, cytotoxicity, interference)

INTRODUCCIÓN

El SURFACEN® es un producto biológico cubano de origen animal obtenido de lavados pulmonares porcinos. Este medicamento se ha utilizado en todo el país y ha contribuido a la reducción del índice de mortalidad infantil por el Síndrome de Dificultad Respiratorio del Recién Nacido (SDRN) (1, 2).

La mayoría de las especies animales destinadas a la producción de biológicos pueden ser fuentes potenciales de transmisión de microorganismos, los cuales pueden estar presentes en la fuente de materia prima o ser introducidos por malas prácticas de producción por parte de los operadores. Para considerar que el producto biológico es seguro se debe realizar una adecuada selección de la materia prima y validar la capacidad de aclaramiento viral de su proceso de producción (3, 4).

Los estudios de validación se han convertido en una parte necesaria y fundamental en la industria biofarmacéutica y son una exigencia de las agencias regulatorias para la comercialización, por otra parte, es una obligación ética de cualquier productor de medicamentos ofertar un producto eficaz y seguro (5, 6).

Previo a los estudios para determinar la capacidad de aclaramiento viral de las etapas del proceso de producción, se deben ajustar las condiciones que permitan asegurar la precisión y validez del estudio. Es esencial descartar la citotoxicidad e interferencia de las muestras generadas durante el reto viral, ya que estas pueden provocar problemas significativos en la titulación de los virus (7, 8).

El propósito de este trabajo fue ajustar los parámetros de procesamiento de las muestras y demostrar la factibilidad de uso de los modelos virales para la validación de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción del SURFACEN®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Citotoxicidad

En el estudio de citotoxicidad se utilizaron las siguientes muestras provenientes del proceso a escala industrial: lavados pulmonares, concentrado de lavados pulmonares, precipitado pulmonar diluido en mezcla metanol-cloroformo, fase metanólica, fosfolípidos en cloroformo y fosfolípidos en acetona. Las muestras se diluyeron 1:5 y 1:10 en solución balanceada de sales (PBS) pH 7.2 con 80 µg/mL de gentamicina, se realizaron ocho réplicas de diluciones seriadas en base 4 en placas de 96 pozos y posteriormente se adicionó 2×10^5 células por mL.

Se emplearon las líneas celulares de riñón de mono verde (Vero C-1008) (ECACC-36132), riñón bovino (MDBK) (ATCC CCL-22) y fibroblasto de curiel (LFBC) (IMV CU 22165 A1) las cuales se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (PAA Laboratorios), 1 % L-glutamina 2 mM (Sigma), gentamicina 80 µg/mL (Sigma) y bicarbonato de sodio 2 g/L (Merck).

En cada ensayo se incluyó un control celular sin la muestra. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante cinco días. El estudio se realizó por triplicado.

Al quinto día los cultivos se observaron al microscopio invertido y se determinó la dilución final donde ocurrieron cambios en la morfología, viabilidad y características de cada cultivo al compararlos con el control celular. La citotoxicidad se clasificó en:

- Toxicidad mínima: hasta la dilución 1:4.
- Toxicidad ligera: hasta la dilución 1:16.
- Toxicidad moderada: hasta la dilución 1:64.
- Toxicidad alta: de la dilución 1:256 en adelante.

Se seleccionó para procesar las muestras la dilución donde la citotoxicidad de las mismas fuera $\leq 1:64$, es decir, una citotoxicidad moderada.

Interferencia

Para el estudio de interferencia viral se utilizaron lavados pulmonares de cerdos, materia prima inicial del proceso de producción del SURFACEN® y los modelos virales con título viral conocido: virus herpes simple humano tipo 1 cepa autóctona No. 7/89 (VHS-1), parvovirus canino cepa autóctona No. 7164, virus de la parainfluenza bovina tipo 3 cepa autóctona (PI-3B), virus de la diarrea viral bovina cepa NADL (VDVB) y el virus de la encefalomiocarditis porcina cepa autóctona (EMC).

Cada modelo viral se diluyó en los lavados pulmonares en proporción 1:10, se tomó una muestra inicial (M1) y se tomó una muestra después de 1h de contacto a temperatura ambiente (M2).

Todas las muestras se procesaron teniendo en cuenta los resultados del estudio de citotoxicidad y se titularon por el método de microtitulación en placas de 96 pozos (9). Se realizaron ocho réplicas de diluciones seriadas en base 4 y se le adicionó la suspensión celular (Tabla 1) a una concentración de 2×10^5 células/mL.

En el estudio se incluyó como control el virus diluido 1:10 en medio suplementado (CV1) el cual se monitoreó de igual forma. Este estudio se realizó por triplicado.

TABLA 1. Sustratos celulares empleados para la replicación de los modelos virales./ *Cellular substrates used for replication of viral models*

Sustrato celular	Modelo viral
Vero 1008	VHS-1 EMC
LFBC	Parvovirus canino
MDBK	VDVB PI-3B

El cálculo de las dosis infectivas medias en cultivo de células ($DICC_{50}/mL$) se realizó por el método de Reed y Muench (10), basado en la lectura del efecto citopático (ECP).

Para demostrar que el procedimiento seleccionado para disminuir la citotoxicidad no influyó sobre los títulos se realizó una comparación entre los títulos de los modelos virales utilizados en el estudio y los del control viral inicial.

Para determinar si existía interferencia para cada modelo viral se compararon los títulos virales de M1 con los de M2 y los títulos virales de M2 con los del control viral inicial.

Se consideró que una muestra no interfería la replicación de los modelos virales cuando las diferencias entre los títulos comparados no fueran mayores de 2 log, además se empleó la prueba de la t de Student para datos pareados para determinar si existían diferencias significativas entre los títulos de los controles virales y las muestras del estudio de interferencia viral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Citotoxicidad. Los resultados del estudio de citotoxicidad se observan en la Tabla 2. Los tres sustratos celulares mostraron cambios ligeros a altos frente a las muestras diluidas 1:5 en PBS con relación al control, mientras fueron mínimos a moderados con la dilución 1:10.

La variación de la citotoxicidad estuvo relacionada con la concentración del material orgánico. En las muestras con alta concentración de materia orgánica (lavados y concentrado de lavados pulmonares) se observó una citotoxicidad de moderada a alta en la dilución 1:5 y ligera en la dilución 1:10, este resultado coincide con el estudio realizado a muestras con similares características (11).

El tipo de solvente influyó en la citotoxicidad, las muestras que contenían metanol resultaron menos tóxicas para los sustratos celulares que las que contenían cloroformo y acetona que además presentaban una alta concentración de material orgánico.

Para disminuir la citotoxicidad de las muestras se pueden aplicar diferentes procedimientos como diálisis, diluciones u otros; la selección del mismo está en dependencia de las características de las muestras (concentración de proteínas y composición). Los métodos utilizados para disminuir la citotoxicidad aseguran que la muerte celular no ocurre por el material de la etapa sino por la acción de los modelos virales sobre los sustratos celulares por lo que permiten obtener resultados más confiables y precisos en los estudios de validación de un producto biológico (3, 12, 13).

TABLA 2. Resultados del estudio de citotoxicidad de las muestras en los sustratos celulares./ *Results of the cytotoxicity studies of the samples in the cellular substrates*

Muestras	Diluciones en PBS	Toxicidad a los sustratos celulares		
		Vero 1008	LFBC	MDBK
Lavados pulmonares	1:5	alta	moderada	moderada
	1:10	ligera	ligera	ligera
Concentrado de lavados pulmonares	1:5	alta	moderada	alta
	1:10	ligera	ligera	ligera
Precipitado pulmonar diluido en mezcla metanol-cloroformo	1:5	moderada	ligera	ligera
	1:10	ligera	ligera	mínima
Fase metanólica	1:5	ligera	ligera	ligera
	1:10	mínima	mínima	mínima
Fosfolípidos en cloroformo	1:5	moderada	moderada	moderada
	1:10	ligera	ligera	moderada
Fosfolípidos diluidos en acetona	1:5	alta	moderada	moderada
	1:10	moderada	ligera	moderada

TABLA 3. Resultados del estudio de interferencia viral de los lavados pulmonares sobre los títulos de los modelos virales utilizados./ *Results of the viral interference studies of the lung washes on the titers of the viral models used*

Modelo viral	Título del Modelo viral	Control viral Inicial CV1	Muestra Inicial (M1)	Muestra final (M2)	Diferencia títulos		
					Modelo viral y CV1	M1 y M2	CV1 y M2
VHS-1	6.58	6.37	6.32	6.2	0.21	0.12	0.17
Parvovirus	9.12	8.91	8.77	8.91	0.21	0	0
PI-3B	8.52	8.22	7.35	7.03	0.3	0.32	1.19
VDVB	7.22	7.17	6.83	6.57	0.05	0.26	0.6
EMC	7.32	7.15	6.9	6.24	0.17	0.66	0.91

log DICC₅₀/mL; **VHS-1**: virus herpes simple tipo 1. **Parvovirus (PC)**: parvovirus canino. **PI-3B**: parainfluenza 3 Bovina. **VDVB**: Virus de la diarrea viral bovina. **EMC**: virus de la encefalomiocarditis porcina.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar como procedimiento para el procesamiento de las muestras la dilución de las mismas 1:10 en PBS, este procedimiento asegura que al incrementar adecuadamente el volumen total de la muestra no disminuye la capacidad de detectar niveles bajos de virus.

Interferencia

En la Tabla 3 se muestra los resultados de la interferencia de los lavados pulmonares sobre la replicación de los cinco modelos virales, al comparar los títulos del CV1 y los modelos virales se observó que estos no disminuyen en más de 0.21 log por lo que quedó demostrado que el procedimiento seleccionado para disminuir la citotoxicidad no influye en el título viral.

Para todos los modelos virales diluidos en los lavados pulmonares la disminución de los títulos iniciales y después de 1h de contacto a temperatura ambiente no fue superior a 2 log (Tabla 3) sin diferencias estadísticamente significativas, lo cual demuestra que esta materia prima no interfiere la replicación de los modelos virales estudiados. Se considera que una muestra es capaz de interferir la replicación de los modelos virales si se demuestra que los títulos virales de las muestras disminuyen en más de 2 log (7,14).

Al comparar los títulos del CV1 y M2 se demostró que después de 1h de contacto a temperatura ambiente el título viral no disminuyó en más de 2 log, con lo cual se corroboró que los lavados pulmonares no interfieren la replicación de los modelos virales seleccionados.

Los estudios de interferencia viral son necesarios para demostrar que la materia prima del producto no interfiere la replicación de los modelos virales; por lo que en los estudios de validación se deben tener en cuenta para no sobrevalorar el nivel de aclaramiento viral de una etapa (3, 14, 15).

Estos resultados demostraron que el lavado

pulmonar, materia prima empleada en el proceso de obtención del SURFACEN®, no interfiere en la replicación de los cinco modelos virales, por lo que estos pueden ser empleados en la validación de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción de este producto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron establecer el procesamiento de las muestras y demostró que los modelos virales seleccionados pueden ser utilizados para realizar los estudios de validación de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción del SURFACEN®.

REFERENCIAS

1. Díaz E, Alfonso W, Manzanares D, Villanueva G. Procedimiento para la obtención de surfactante pulmonar. 2004. República de Cuba, A 61K 35/12, 35/42.
2. Blanco O, Riverón Y, Armas E, Sánchez J, Faure R, Fernández O. SURFACEN® inhibe el crecimiento de bacterias causantes de infecciones respiratorias. *Biotechnología Aplicada* 2005; 22:279-281.
3. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EAEMP). Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on assessing the risk for virus transmission –new chapter 6 of the note for guidance on plasma derived medicinal products. 2004. CPMP/BWP/S180/03,
4. Boschetti N, Johnston A. Virus elimination and validation. *Methods Mol Biol* 2005; 308:209-219.

5. Brorson K, Norling L, Hamilton E, Lute S, Lee K, Curtis S, et al. Current and future approaches to ensure the viral safety of biopharmaceuticals. *Dev Biol*. 2004; 118:17-29.
6. Diblasi K, Jornitz MW, Gottschalk U, Priebe PM. Disposable Biopharmaceutical process-myth or reality?. *BioPharm Intern* 2007; 30:19-24.
7. Darling AJ. Validation of biopharmaceutical purification processes for virus clearance evaluation. *Mol Biotechnol* 2002; 21(1):57-83.
8. Kern G, Krishnan M. Virus removal by filtration: points to consider. *BioPharm International* 2006; 29:32-41.
9. Johnson VA; Byington RE. Infectivity assay (virus yield assay). In: *Techniques in HIV research* (Aldovani A and Walker BD, Eds.). Stockton Press. New York. 1990; 71-76.
10. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am J Hyg*. 1938; 27:493-497.
11. Tuñón MA, Noa E, Sánchez K, Ruibal IJ, Dubed M, Castañeda F, et al. Desescalado del proceso de producción de HEBERTRANS® con vistas a su validación viral. *Biotecnología Aplicada* 2004; 21(4):229-233.
12. Krause S. A guide for testing biopharmaceuticals. Part 2: acceptance criteria and analytical method maintenance. *BioPharm International* 2006; 29:42-53.
13. VIRASURE. Virus removal: A shifting paradigm?. *VIRASURE Magazine* 2007; Jan:1-3.
14. Brorson K. Advances in viral clearance. In: *Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry*. Ed by Shukla AA; Etzel MR; Gadam S. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007; 15:449-462.
15. Barin F. La sécurité virale des médicaments d'origine biologique. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2008; 66:129-139.

(Recibido 15 junio 2010; Aceptado 30-9-2010)