

Propiedad de inactivación viral durante la obtención de la Melagenina® Plus en la etapa de almacenamiento

✉ Leonor I Lobaina¹, Enrique Noa¹, Ana M Hernández², Marta Dubed¹,
Leonor M Navea¹, José R Pérez²

¹ Laboratorios de Investigaciones del Sida, Lisida
Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba

² Planta de Derivados de la Placenta, Centro de Histoterapia Placentaria
Carretera de la Autopista Novia del Mediodía y 173, Valle Grande, La Lisa, La Habana, Cuba
E-mail: lisida@infomed.sld.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Este artículo presenta la validación de la propiedad de inactivación viral de la Melagenina® Plus en la etapa de almacenamiento: producto biológico cubano para el tratamiento del vitiligo. La etapa se retó con altas cargas virales de cuatro modelos virales de tres virus envueltos y uno no envuelto, y de genoma ARN (dos) o ADN (dos), respectivamente: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus del herpes porcino tipo 1 (VHP-1) y parvovirus canino (PVC). El título viral se determinó por el método de Reed y Muench basado en el efecto citopático viral; y los factores de reducción se calcularon por la diferencia de la carga viral al inicio y al final de la etapa. La inactivación de los virus envueltos se logró entre el primero y el tercer día, y la inactivación del modelo de virus no envuelto (PVC), a los 21 días. La disminución de la carga viral fue altamente significativa ($p < 0.0001$), determinada por la temperatura de almacenamiento ($30 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) y la concentración de alcohol (mínima: 71 %). Los factores de reducción alcanzados en esta etapa para los modelos virales (VIH-1: 5.0 log; VDVB: 3.5 log; VHP-1: 4.24 log; PVC: 5.8 log) le confieren un adecuado nivel de seguridad al proceso de producción de la Melagenina® Plus.

Palabras clave: Melagenina Plus, almacenamiento, inactivación, factor de reducción

Biotecnología Aplicada 2013;30:45-50

ABSTRACT

Capacity of viral inactivation of the Melagenina® Plus storing step. This work was aimed at validating the viral inactivation property during the storage step of the production process of Melagenina® Plus, which is a Cuban biological product for the treatment of vitiligo. The product was challenged at storage with high loads of four viral models, corresponding to three enveloped and one non-enveloped virus, two of them RNA and the other two DNA viruses: the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the bovine viral diarrhea virus (BVDV), the porcine herpes virus type 1 (PHV-1) and the canine parvovirus (CPV). The viral titer was determined using the Reed-Muench method based on the viral cytopathic effect, and reduction factors were calculated as the difference of viral loads at the beginning and the end of the step. Enveloped viruses were inactivated between days 1 to 3, and the enveloped virus (CPV) was achieved after 21 days. The viral load showed a very highly significant decrease ($p < 0.0001$), being conditioned to storage temperature ($30 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) and ethanol concentration (71 % minimum). The reduction factors achieved on this step (1:5.0 log for HIV-1; 3.5 log for BVDV; 4.24 log for PHV-1 and 5.8 log for CPV) characterized the adequate level of safety of the Melagenina® Plus production process.

Keywords: Melagenina Plus, storage, inactivation, reduction factors

Introducción

La placenta humana es un órgano rico en sustancias biológicamente activas e inoñas que se utilizan en la formulación de medicamentos y cosméticos. La Melagenina® Plus es uno de estos productos farmacéuticos, reconocido internacionalmente, para el tratamiento del vitiligo, enfermedad dermatológica que afecta el 1 % de la población mundial [1, 2].

Su origen biológico obliga al productor a cumplir las exigencias reguladoras internacionales, nacionales (del Centro Estatal para el Control de Medicamento, Cuba) y de los clientes. Estas comienzan con el control en la selección y examen de la materia prima: la placenta humana. Este órgano puede estar infectado por una gran variedad de virus de ADN o ARN [3-5], por lo que existe el riesgo de transmisión de agentes infecciosos.

Ante las limitaciones que tiene el estudio de las placentas (no abarcar los posibles contaminantes virales

de la placenta, la duración del periodo de ventana de las infecciones virales, y los niveles de sensibilidad de los ensayos empleados) es necesario validar la propiedad de aclaramiento viral del proceso de producción. Ello garantiza la seguridad del medicamento y una elevada probabilidad de que cualquier virus conocido o desconocido, insospechado o peligroso presente en la placenta, pueda ser removido o inactivado [6, 7].

La Melagenina® Plus es un producto que resulta de la adición de calcio al ingrediente farmacéutico activo (IFA) de la loción Melagenina®. La validación del proceso de fabricación de esta última demostró que la seguridad de este extracto placentario está dada por su almacenamiento en solución alcohólica a una concentración mínima de 71 % a temperatura ambiente ($30 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) [8].

Teniendo en cuenta que el proceso de producción de estos dos extractos de la placenta humana solo

1. Miyares C. Melagenina® Plus. Avances Médicos en Cuba. 2000;7(23):50-2.

2. Miyares CM, inventor; Centro de Histoterapia Placentaria, assignee. Composition for stimulating the synthesis of the melanic pigment and process for obtaining it. United States patent US 6660305. 2003 Dec 9.

3. Centro para el control estatal y la calidad de los medicamentos. Regulación No. 2/2002. Placenta humana como materia prima farmacéutica. La Habana: Cecmed; 2002.

4. Chow SS, Craig ME, Jacques CF, Hall B, Catteau J, Munro SC, et al. Correlates of placental infection with cytomegalovirus, parvovirus B19 or human herpes virus 7. J Med Virol. 2006;78(6):747-56.

difiere por la adición de calcio al IFA, se verificó que esto no afecta la seguridad de la Melagenina® Plus.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Investigaciones del Sida (Lisida, Cuba), equipado con los recursos necesarios para el escalado inverso del proceso y su validación. Se contó con el personal calificado de la Planta de Derivados de la Placenta (Deplacén, Cuba) y se siguieron las normas recomendadas por las agencias reguladoras nacionales e internacionales [3, 7, 9].

Muestras

En el estudio se utilizaron dos lotes de Melagenina® Plus y uno de la loción Melagenina® como control. También se utilizaron alcohol fino clase A al 95 % y cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂, Quimivita, S.A., España), todos certificados como Liberados por el Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad de Deplacén.

Estudio de reto simulado

Se tomaron tres frascos de cada uno de los lotes de Melagenina® Plus y de la loción Melagenina® incluidos en el estudio. A uno de estos frascos se le adicionó medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, en una proporción 1:5 (v/v); a otro frasco se le adicionó medio de cultivo suplementado en una proporción 1:10 (v/v); y el tercero permaneció como control. El estudio se hizo por triplicado. Todas las muestras se identificaron con un código y se enviaron al Laboratorio de Control Químico perteneciente a la Subdirección de Aseguramiento de la Calidad de Deplacén, donde se les hicieron los controles químicos, microbiológicos y biológicos establecidos a escala industrial.

Para determinar la actividad melanocitopoyética se siguió la metodología descrita por Martínez y cols. [10]. Grupos de tres ratones C57BL/6 de sexo masculino con un peso de 20 a 22 g, fueron tratados tópicamente en las orejas por cinco días consecutivos con cada lote de producto expuesto a los tratamientos descritos o placebo (excipiente sin IFA). A las 72 h de la última aplicación se sacrificó los animales, se tomó muestras de la epidermis de las orejas y se procesaron con la técnica histoquímica de la L-Dopa.

Modelos virales

Los modelos virales se seleccionaron según su similitud con los posibles contaminantes virales de las placetas, su resistencia a los agentes físicos y químicos,

y la relevancia en la transmisión por sangre y hemo-derivados. Los modelos fueron de virus envuelto o no envuelto, y de genoma ARN o ADN, respectivamente: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus del herpes porcino tipo 1 (VHP-1) y parvovirus canino (PVC) (Tabla 1).

Para la producción de las cepas controles de altos títulos se utilizaron líneas celulares controladas en el Lisida y medios de cultivo producidos y liberados por el Laboratorio de Cultivo de Células del Lisida (Tabla 1). Cada cepa viral se multiplicó en su sustrato celular específico a una multiplicidad de infección de 0.3.

La titulación de los inóculos virales se efectuó por el método de microtitulación en placas de 96 pozos, según Johnson y Byington [11]. La dosis infecciosa media en el cultivo de células (DICC₅₀/mL) se calculó en base al efecto citopático, según el método de Reed y Muench [12]. Para el VIH-1, se cuantificó el antígeno p24 utilizando el estuche DAVIH Ag p24 (Davihlab, Cuba).

Estudio de citotoxicidad

El tratamiento para disminuir la citotoxicidad a las muestras de Melagenina® Plus, de loción Melagenina®, y a las soluciones de alcohol al 71 % y de CaCl₂ (1 mg/mL), estas dos últimas preparadas en agua purificada, se realizó por triplicado para cada uno de los sustratos celulares. Un volumen de las muestras se diluyó en dos y en cuatro volúmenes de solución balanceada de sales (SBS), pH 7.2. Se hicieron diluciones seriadas de base 4, a las que se adicionó la concentración celular específica para cada sustrato celular (línea celular MT4: 5 × 10⁵ células/mL; y 2 × 10⁵ células/mL para el resto de los sustratos celulares) y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Al cuarto día se observaron los cultivos al microscopio invertido, y se determinó hasta qué dilución las muestras resultaron tóxicas, en comparación con los controles celulares sin muestras. Se estableció como dilución de trabajo para procesar las muestras aquella donde la citotoxicidad resultó de moderada a mínima.

Estudio de interferencia

A las muestras incluidas en el estudio de citotoxicidad se les adicionaron los modelos virales, en la dilución determinada en el estudio de reto simulado. Se homogenizaron y se tomó una muestra (M1). Se dejaron en contacto durante 1 h a temperatura ambiente y se tomó una segunda muestra (M2). Se incluyó una

5. Indolfi G, Moriondo M, Galli L, Azzari C, Poggi GM, Resti M, et al. Mother-to-infant transmission of multiple blood-borne viral infections from multi-infected mothers. *J Med Virol.* 2007;79(6):743-7.

6. Barin F. La sécurité virale des médicaments d'origine biologique. *Ann Pharm Fr.* 2008;66(3):129-39.

7. Food and Drug Administration. Current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals. Subpart E- Control of Components and Drug Product Containers and Closures § 211.80 General requirements (21 CFR 211.80). Rockville MD: Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services; 2008.

8. Noa E, Hernández AM, Ruibal I, Dubed M, Navea L, Lobaina L, et al. Validación de la capacidad de inactivación viral del proceso de producción del extracto placentario loción Melagenina®. *Rev Cub Farmacia* 2002;36(Suppl 1).

9. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for Guidance on Virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit; 1996 Feb. CPMP/BWP/269/95. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003684.pdf

10. Martínez L, Sanz A, Miyares CM, Hollands I, Roque S, Pimienta R, et al. Estudio comparativo del efecto pigmentante de dos extractos de placenta humana (Melagenina I y II). In: *La histoterapia placentaria en algunas afecciones dermatológicas*. La Habana: Palacio de las Convenciones; 1994.

11. Johnson VA, Byington RE. Infectivity assay (virus yield assay) In: Aldovani A, Walker BD, editors. *Techniques in HIV Research*. New York: Stockton Press; 1990. p. 71-6.

12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am J Hyg* 1938;27(3):493-7.

Tabla 1. Modelos virales seleccionados para el estudio de validación

Modelo viral ^a	Genoma / envoltura	Tamaño (nm)	Sustrato celular / Medio de cultivo	Resistencia a inactivación	Tipos virales
VIH-1	ARN / envuelto	80 - 100	MT4 / RPMI-1640	Baja	Retrovirus humanos
VDVB	ARN / envuelto	45 - 60	MDBK / MEM	Moderada	Virus de la hepatitis C y virus ARN envueltos
VHP-1	ADN / envuelto	150 - 200	Vero C-1008 / MEM	Baja a Moderada	Virus de la hepatitis B y virus ADN envueltos
PVC	ADN / no envuelto	18 - 26	LFBC / MEM	Muy alta	Parvovirus B19, virus de la hepatitis A, virus ADN y ARN no envueltos

^a Modelos virales: VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (cepa IIB); VDVB: virus de la diarrea viral bovina (cepa NADL); VHP-1: virus del herpes porcino tipo 1 (cepa Stendal); PVC: parvovirus canino (cepa autóctona No. 7164).

MT4: línea de células T humanas transformadas por cocultivo con linfocitos portadores de HTLV-I.

MDBK: línea celular de riñón bovino.

Vero C-1008: línea celular de riñón de mono verde (clon 1008).

LFBC: línea celular de fibroblasto de curiel.

muestra control de cada inóculo viral, que se diluyó en un medio suplementado y se sometió a las mismas condiciones de las muestras. El estudio se realizó por triplicado.

Las muestras se procesaron teniendo en cuenta los resultados del estudio de citotoxicidad y se les realizaron diluciones seriadas iguales a las del método para determinar el título de los inóculos virales. Se consideró que había interferencia viral si los títulos virales en presencia de las muestras de interés (extractos placentarios) disminuyeron en más de 2 logaritmos.

Estudio de inactivación durante el almacenamiento de la Melagenina® Plus

Para el reto de la etapa de almacenamiento se empleó un frasco de cada lote seleccionado de Melagenina® Plus, que representa el 0.03 % de la cantidad de frascos que conforman un lote industrial, los cuales se infectaron con los modelos virales en la proporción 1:5 o 1:10 (v/v), según los resultados del estudio de reto simulado. Inmediatamente después de la adición de cada modelo viral al frasco de cada lote, se tomó una muestra que se consideró como la carga viral inicial (CVi), y los frascos se almacenaron a temperatura ambiente.

Se realizó una cinética de inactivación para los virus envueltos que se monitoreó los días 1; 2; 3 y 7 de almacenamiento. Esta última se consideró como la carga viral final (CVf). Del modelo para virus no envueltos se tomaron muestras en estos mismos intervalos de tiempo y los días 14; 21 y 28 de almacenamiento, considerando este último como la CVf. El estudio se realizó por triplicado.

En este estudio se incluyeron diferentes controles:

- Cepa viral diluida en solución de CaCl₂ (1 mg/mL) y de etanol al 71 %, ambas preparadas en agua purificada.

- Cepa viral diluida en un medio de cultivo suplementado (almacenada a temperatura ambiente, a 4 °C y a -85 °C).

- Un frasco del lote de loción Melagenina®, para comprobar si el precipitado que se observa en la Melagenina® Plus, luego de adicionar el cloruro de calcio, tenía alguna incidencia en la propiedad de inactivación en la etapa de almacenamiento.

Las muestras controles se conservaron a la misma temperatura de almacenamiento de la Melagenina® Plus y las cargas virales se cuantificaron en los mismos intervalos de tiempo.

Cálculo del factor de reducción

El factor de reducción (FR) en la etapa de almacenamiento se calculó según la ecuación [9, 12]:

$$FR = \log \left[\frac{(V_1 \times CV_i)}{(V_2 \times CV_f)} \right]$$

donde:

V₁ y CV_i: volumen y carga viral inicial de la muestra; V₂ y CV_f: volumen y carga viral final de la muestra.

La etapa del proceso se clasificó como efectiva, moderadamente efectiva e inefectiva, de acuerdo con los logaritmos de reducción viral que aportó el Comité para la Propiedad de Productos Medicinales [9].

Análisis estadístico

El análisis de los resultados del reto viral se realizó mediante el programa Statgraphics Plus (Statpoint Technologies, Inc., EE.UU.), versión 5.0 (2000). Se aplicó el estadígrafo de la prueba t de Student para los datos pareados, que permitió conocer la significación estadística al comparar la CVi con las detectadas en los intervalos de tiempo evaluados en cada modelo.

Resultados y discusión

Reto simulado

La adición del medio suplementado en una proporción 1:5 (v/v), a la Melagenina® Plus y a la loción Melagenina®, alteró significativamente (p < 0.01) varios parámetros de calidad de estos productos como la concentración del etanol, la absorción, el colesterol, el nitrógeno y las proteínas, por lo que no se aceptaron y se rechazó hacer el reto viral con el medio suplementado en esa proporción.

La determinación de los parámetros de calidad de los lotes de ambos extractos con medio suplementado en una proporción 1:10 (v/v), también mostró una alteración no significativa de algunos parámetros físico-químicos: absorción, residuos por evaporación, colesterol, nitrógeno y proteínas (Tabla 2). La concentración lipídica se mantuvo en los límites de aceptación establecidos. Este parámetro se considera muy importante en la actividad melanocitopoyética de los extractos placentarios [2, 13].

Los resultados de la actividad biológica de la Melagenina® Plus diluida en un medio de cultivo 1:10 (v/v), sobre los melanocitos de ratones no mostraron dife-

13. González Y, Salcedo G, García W, Hernández CR, Brito N. Validación de la técnica espectrofotométrica de cuantificación de lípidos totales para el control de la calidad de los extractos de placenta. In: Memorias II Seminario Internacional de Histoterapia Placentaria. La Habana: Centro de Histoterapia Placentaria; 2006.

Tabla 2. Resultados del control de calidad de los lotes de la loción Melagenina® y la Melagenina® Plus en el estudio de reto simulado de la etapa de almacenamiento*

Producto	Frasco ^a	pH	Alcohol (%)	Densidad (g/mL)	Absorción mínima (UA)	Absorción máxima (UA)	Residuos por evaporación (g/100 mL)	α amino-ácidos (mg/100 mL)	Colesterol (mg/100 mL)	Lípidos (mg/100 mL)	Nitrógeno (mg/100 mL)	Proteínas (mg/100 mL)	Concentración de calcio (mg/100 mL)
Loción Melagenina® L-01007	1	7.34	83	0.85	206:1.31	257:0.16	0.33	20	15 ^b	85.76	10.68	66.72	np
	2	7.87	74	0.85	204:3.8 ^b	nd	0.04 ^b	30	15.5 ^b	121.2	9.8	61.25	np
Melagenina® Plus L-01034	1	6.28	83	0.85	205:1.33	257:0.2	0.55	30	13 ^b	106.1	9.66	60.4	0.36
	2	6.94	74	0.86	204:1.65	255:0.01	0.725	40	12.5 ^b	90.91	24.43 ^b	152.7 ^b	0.4
Melagenina® Plus L-02003	1	6.37	83	0.85	206:1.36	257:0.19	0.465	20	34	90.91	10.33	64.53	0.35
	2	7.07	74	0.856	204:4.9 ^b	nd	0.615	30	32.5	90.91	8.22	51.4	0.36

* Se muestran los valores promedio de tres réplicas por frasco. Todas las condiciones ensayadas cumplieron con las características organolépticas y mostraron diferencias significativas en el ensayo de actividad biológica.

^a Frasco 1: control; Frasco 2: medio 1:10 (v/v); b parámetro alterado.

nd: no determinado; np: no procede.

rencias significativas con los animales tratados con la loción Melagenina® ni con el lote control del producto (Tabla 2), por lo que se aceptaron. Esta proporción se seleccionó para el reto viral de la etapa de almacenamiento.

En el estudio de validación viral se consideran aspectos cruciales: el diseño adecuado del proceso de producción a escala de laboratorio y los resultados del reto simulado, para demostrar la influencia del medio de cultivo en el que se van a diluir los agentes infecciosos sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos establecidos para el producto [14-16].

Estudio de citotoxicidad

La citotoxicidad de las muestras resultó de mínima a moderada (Tabla 3). Las muestras diluidas 1:2 (v/v) en SBS mostraron una citotoxicidad de ligera a moderada, mientras las diluidas 1:5 (v/v) revelaron cambios mínimos o no perceptibles en las células. No se observaron diferencias entre los dos lotes de Melagenina® Plus ni de estos con el de la loción Melagenina®. Tales resultados fueron determinantes para seleccionar la dilución 1:2 (v/v) en SBS, como el procedimiento para disminuir la citotoxicidad de las muestras.

Para la disminución de la citotoxicidad se han empleado diferentes métodos (diálisis, cromatografías de gel filtración, precipitación y diluciones); pero en todos se debe tener en cuenta que no deterioren los títulos virales y la posibilidad de detectar bajas cargas virales [9, 15, 16].

Estudio de interferencia viral

Los resultados del estudio de interferencia viral estuvieron determinados por la disminución o no del título de los modelos virales en las muestras, en comparación con los modelos controles (Tabla 4). Los controles virales diluidos 1:10 (v/v) en medio de cultivo suplementado, tuvieron una disminución en sus títulos menor que 1 log.

Al adicionar los modelos de virus envueltos en los extractos placentarios se detectó una rápida disminución de los títulos virales de 2 o más logaritmos con diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control viral. Después de 1 h de incubación se detectaron cargas virales al nivel del límite de detección del sistema de titulación, con diferencias muy significativas ($p < 0.01$). Un comportamiento muy similar se observó en el control viral disuelto en la solución de etanol al 71 % (Tabla 4). Con PVC no se detectaron diferencias significativas entre los títulos virales, independientemente de la presencia del etanol.

Estos resultados coinciden con los de otros grupos de trabajo que han observado marcada susceptibilidad a los solventes lipídicos por los virus envueltos, y en especial a concentraciones de alcohol superiores al 70 %; no así por los virus no envueltos [6, 17, 18].

Estos resultados demostraron que los extractos placentarios no interfieren en la replicación de los modelos virales. El estudio de interferencia viral permitió conocer la acción de las materias primas y los productos biológicos sobre el título de los modelos virales, así como la adecuada selección de los modelos virales para el estudio de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción de la Melagenina® Plus.

Tabla 3. Resultados del estudio de citotoxicidad de las muestras a retar en los sustratos celulares*

Muestras	Diluciones en SBS	Toxicidad en los sustratos celulares			
		MT4	Vero 1008	MDBK	LFBC
CaCl ₂ (1 mg/mL)	1:2	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima
	1:4	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No tóxico
Etanol 71 %	1:2	Ligera	Ligera	Ligera	Ligera
	1:4	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima
Loción Melagenina® L-01007	1:2	Ligera	Ligera	Ligera	Ligera
	1:4	Mínima	Ligera	Mínima	No tóxico
Melagenina® Plus L-01034	1:2	Ligera	Moderada	Ligera	Ligera
	1:4	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima
Melagenina® Plus L-02003	1:2	Moderada	Moderada	Ligera	Ligera
	1:4	Mínima	Mínima	Mínima	Mínima

* Se muestran los valores promedio de tres réplicas por dilución. La toxicidad se expresa en función del mayor número de diluciones (v/v) aplicada al sistema de titulación viral: mínima (1:4), ligera (1:16), moderada (1:64) o alta (1:256).

SBS: solución balanceada de sales.

MT4: línea de células T humanas transformadas por cocultivo con linfocitos portadores de HTLV-I.

Vero C-1008: línea celular de riñón de mono verde (clon 1008).

MDBK: línea celular de riñón bovino.

LFBC: línea celular de fibroblasto de curiel.

Capacidad de inactivación viral de la Melagenina® Plus en la etapa de almacenamiento

Los resultados del comportamiento de los modelos de virus envueltos durante el almacenamiento de la Melagenina® Plus se representan en la figura 1. No hubo diferencias significativas entre los títulos virales cuantificados en los dos lotes de Melagenina® Plus y el de los controles utilizados en el estudio (loción Melagenina® y solución de alcohol al 71 %). Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la CVi en las muestras que contenían alcohol y los controles virales, similares al estudio de interferencia viral.

Los tres modelos virales revelaron un comportamiento típico de los virus con una baja resistencia a los solventes orgánicos, caracterizado por una caída brusca del título viral y la inactivación completa en un corto intervalo de tiempo, relacionada con la resistencia al etanol, propia de cada uno. En todos los casos se detectaron diferencias altamente significativas entre la CVi y la cuantificada a las 24 h ($p < 0.001$) (Figura 1).

La inactivación del VHP-1 utilizado para la infección de los dos extractos placentarios, se logró en las

14. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for Guidance on Plasma-Derived Medicinal Products. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product, Evaluation of Medicines for Human Use; 2001 Jan. CPMP/BWP/269/95 rev. 3. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003613.pdf

15. Darling A. Validation of biopharmaceutical purification processes for virus clearance evaluation. Mol Biotechnol. 2002;21(1):57-83.

16. Tuñón MA, Noa E, Sánchez K, Ruibal JJ, Dubed M, Castañeda F, et al. Desescalado del proceso de producción de Hebertrans® para su validación viral. Biotecnol Apl. 2004;21:229-33.

17. Azzi A, Maggi F, Zakrzewska K, Menconi MC, Di Pietro N, Salotti V, et al. Different behavior of erythrovirus B19 and torquetenovirus in response to a single step of albumin purification. Transfusion. 2006;46(7):1162-7.

Tabla 4. Resultados del estudio de interferencia viral de los extractos placentarios sobre los títulos de los modelos virales utilizados en la validación viral†

Modelo viral ^a	Control viral (1:10) ^b		Etanol 71 %		Loción M L-01007 ^b		M Plus L-01034 ^b		M Plus L-02003 ^b	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
VIH-1 ^c	6.20	6.13	4.21*	1.3**	4.01*	1.3**	3.24*	1.3**	3.96*	1.3**
VDVB	6.14	5.82	3.31*	1.3**	3.63*	1.3**	3.2*	1.3**	3.81*	1.3**
VHP-1	6.85	6.51	4.11*	1.3**	4.21*	1.3**	3.65*	1.3**	3.91*	1.3**
PVC	7.92	7.92	7.22	6.89	7.25	6.86	7.32	6.57	7.20	6.85

† Se muestran los valores promedio de tres réplicas para cada ensayo, y la significación estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

^a Modelos virales: VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; VDVB: virus de la diarrea viral bovina; VHP-1: virus del herpes porcino tipo 1; PVC: parvovirus canino.

^b Datos expresados en log DICC₅₀/mL.

^c Título viral medio entre el cuantificado por efecto citopático y ELISA Ag p24.

Loción M: loción Melagenina®.

M Plus: Melagenina® Plus.

M1: muestra homogenizada de cada sustrato celular justo tras la adición de cada modelo viral, en la dilución determinada en el estudio de reto simulado; M2: muestra tomada tras la incubación del modelo viral con el sustrato celular, durante 1 h a temperatura ambiente.

primeras 24 h del almacenamiento de estos; al igual que en la solución de alcohol al 71 % (Figura 1). Mientras que en los virus ARN, para el VIH-1 se alcanzó entre el primero y el segundo día de almacenamiento de la loción Melagenina®, y entre el segundo y el tercer día para los dos lotes de Melagenina® Plus. Para el VDVB se logró en las 24 h de almacenamiento de la Melagenina® Plus y a las 48 h de almacenamiento de la loción Melagenina® y la solución de alcohol al 71 %. En ninguno de los tres modelos virales se evidenciaron diferencias significativas entre las cargas virales detectadas en cada monitoreo.

El VDVB es sensible a los solventes lipídicos y a los detergentes químicos; pero tiende a estabilizarse con la adición de proteínas [15, 19]. En este estudio, la inactivación del VDVB no estuvo relacionada con la cantidad de precipitado lipídico en los extractos placentarios, pues esta se alcanzó en cortos periodos de almacenamiento.

A distintas temperaturas hubo diferencias en los títulos de los controles de virus envueltos almacenados. Ocurrió una disminución de los títulos virales en los almacenados a temperatura ambiente; no así en los conservados a 4 y a -85 °C (Figura 1). Para el VIH-1 se constató una diferencia significativa del título ($p < 0.05$) al séptimo día de almacenamiento a temperatura ambiente, con respecto al cuantificado para el control viral conservado a 4 °C. Para el VHP-1, estas diferencias se detectaron a partir del tercer día ($p < 0.05$) y se mantuvieron hasta el séptimo día.

En el VDVB, estas diferencias se constataron a partir de las 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente ($p < 0.05$); fueron muy significativas a partir de las 48 h ($p < 0.01$); y se mantuvieron hasta el séptimo día.

Estos resultados coinciden con los de Ruibal y cols. [20] relativos a la validación del proceso de producción de la inmunoglobulina intravenosa, quienes observaron una caída del título del VDVB de más de 6 log cuando se almacenó a 21 °C durante 21 días, mientras que el almacenamiento a 4 °C no afectó al virus.

La disminución de los títulos virales de los controles almacenados a temperatura ambiente, con respecto a los almacenados a bajas temperaturas, demuestra que el almacenamiento del extracto placentario a temperatura ambiente refuerza la capacidad inactivante en esta etapa.

La cinética de inactivación de los modelos virales en la muestra de CaCl_2 no mostró diferencias en relación con el control viral a temperatura ambiente; solamente en el VHP-1 se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambas (Figura 1). Ello demuestra que la disminución del título viral se debió a la acción de la temperatura de almacenamiento.

En la figura 2 se representan los resultados de la cinética de inactivación del modelo de virus no envueltos en esta etapa. A las 24 h de almacenamiento, se observó una caída del título viral en todas las muestras contenidas en alcohol, con diferencias muy significativas ($p < 0.01$) en relación con la CVi.

El segundo día de almacenamiento se detectó una carga viral en el límite de detección del sistema de titulación, con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$), que se mantuvo estable para todas las muestras hasta el séptimo día de almacenamiento. A

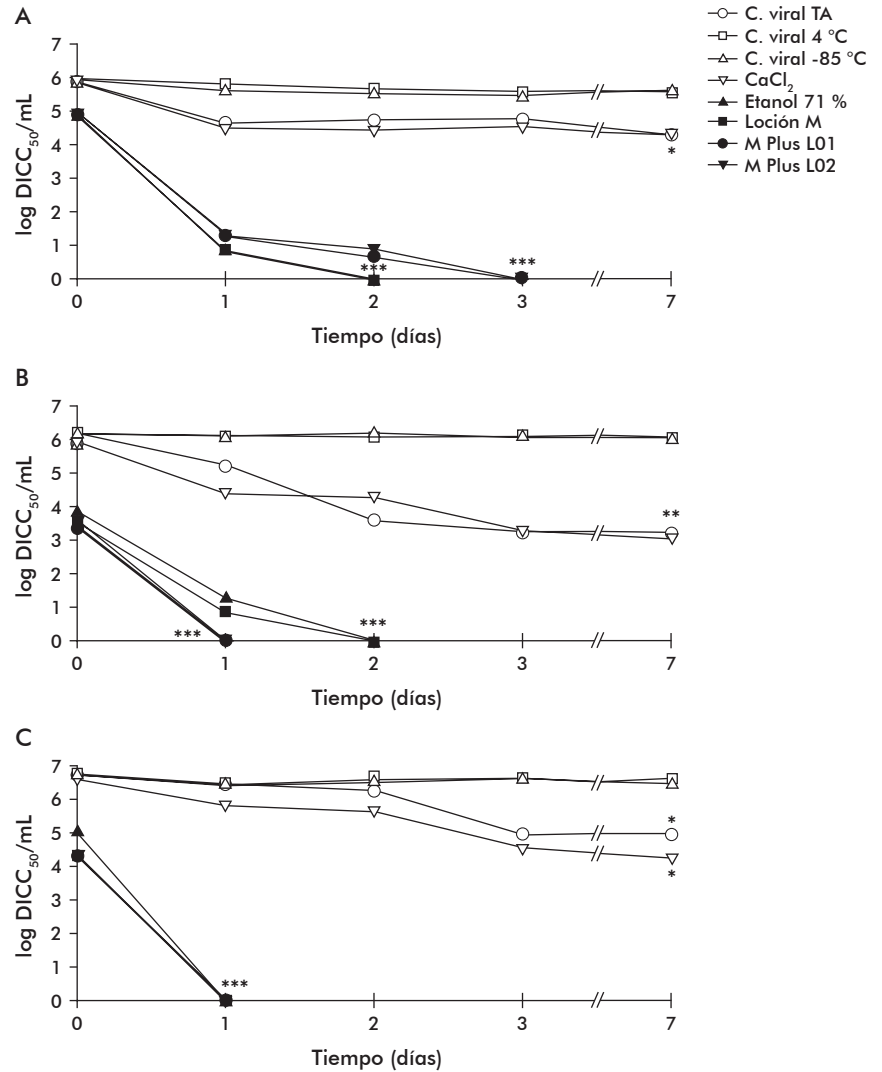


Figura 1. Cinética de inactivación de los modelos de virus envueltos: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (A), virus de la diarrea viral bovina (B) y virus del herpes porcino tipo 1 (C), durante el almacenamiento del extracto placentario (n = 3). C. viral TA: control viral a temperatura ambiente; C. viral 4 °C: control viral a 4 °C; C. viral -85 °C: control viral a -85 °C; CaCl_2 : cloruro de calcio 1 mg/mL; Loción M: Loción Melagenina®; M Plus L01: Melagenina® Plus Lote 01034; M Plus L02: Melagenina® Plus Lote 02003. Se indican los niveles de significación estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

los 14 días se logró la inactivación total de este modelo viral en la loción Melagenina®; mientras la de los dos lotes de Melagenina® Plus y de la solución de alcohol al 71 % se logró a los 21 días (Figura 2).

Los títulos de los controles conservados a 4 °C y a -85 °C se mantuvieron estables durante los 28 días que duró el estudio de almacenamiento (Figura 2); mientras que los títulos a temperatura ambiente disminuyeron a partir del séptimo día. Este resultado fue significativo a partir del día 14; muy significativo a partir del 21 y altamente significativo el día 28 del almacenamiento ($p < 0.001$), pues la carga viral disminuyó en 5.41 log.

La cinética de inactivación del parvovirus en la solución de CaCl_2 tuvo un comportamiento muy similar al del control viral almacenado a temperatura ambiente. Ello evidencia que el CaCl_2 a esta concentración

18. Suchomel M, Gnant G, Weinlich M, Rotter M. Surgical hand disinfection using alcohol: the effects of alcohol type, mode and duration of application. J Hosp Infect. 2009;71(3):228-33.

19. Rivera H. Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. Rev Investig Vet Perú. 2008;19(2):93-112.

no tiene capacidad inactivante, y la que influye es la temperatura del almacenamiento.

Los resultados de esta investigación corroboran el estudio de la capacidad de investigación viral en la etapa de almacenamiento del extracto placentario de la loción Melagenina®, en el que los virus envueltos se inactivaron en un corto periodo (24 h); mientras que en los no envueltos (PVC) se constató una carga viral residual aún a las 72 h de almacenamiento [7].

La total inactivación del PVC en el almacenamiento de la Melagenina® Plus le confiere una elevada seguridad al proceso de producción y al producto en sí. Esta consideración tiene en cuenta la elevada resistencia de este virus a los agentes inactivantes; lo cual permite no solo considerarlo como modelo relevante para las familias de virus no envueltos que pueden infectar la placenta humana, sino como un modelo viral no específico, que aporta evidencias de la capacidad del proceso para inactivar nuevas o impredecibles contaminaciones virales de la fuente de materia prima [7, 9, 15].

En la tabla 5 se representan los FR de la etapa de almacenamiento de los dos extractos placentarios y el tiempo en que se logró inactivar la carga viral utilizada para el reto. La inactivación de los virus envueltos ocurrió de forma rápida: en la Melagenina® Plus se logró en los tres primeros días; y en la loción Melagenina®, entre los dos primeros días, sin diferencias significativas. La inactivación del modelo viral no envuelto se alcanzó después de 14 días de almacenamiento de la loción Melagenina®, mientras que en la Melagenina® Plus se logró a los 21 días, con diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre el tiempo requerido para cada extracto placentario.

Se observó diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) entre los tiempos en que se logró la inactivación de los virus envueltos y los no envueltos. La diferencia de tiempo en que se logra la inactivación de los modelos virales en ambos extractos placentarios está relacionada con la presencia de una mayor cantidad de precipitado (lípidos) en la Melagenina® Plus, los cuales pueden formar enrejados que evitan la acción del agente inactivante sobre el virus; por lo que se requiere un periodo mayor para lograr su inactivación total.

Resultados muy similares se observaron en la validación del extracto placentario EP-100 con los modelos de virus envueltos; no ocurrió así con el modelo de virus no envueltos, pues se requirió un mayor periodo de almacenamiento (63 días) para su total inactivación [21]. Ello está relacionado con la temperatura de almacenamiento (4 °C) y la concentración de etanol presente en el extracto EP-100. Tal resultado corrobora que estos dos factores son fundamentales para la seguridad del extracto placentario Melagenina® Plus.

Excepto para el VDVB, en todos los casos se aportó un FR mayor de 4 log y la etapa de almacenamiento de la Melagenina® Plus resultó efectiva para inactivar todos los modelos virales empleados. Se logró inactivar la carga viral con que se retó la etapa, tanto para virus envueltos como para virus no envueltos; y

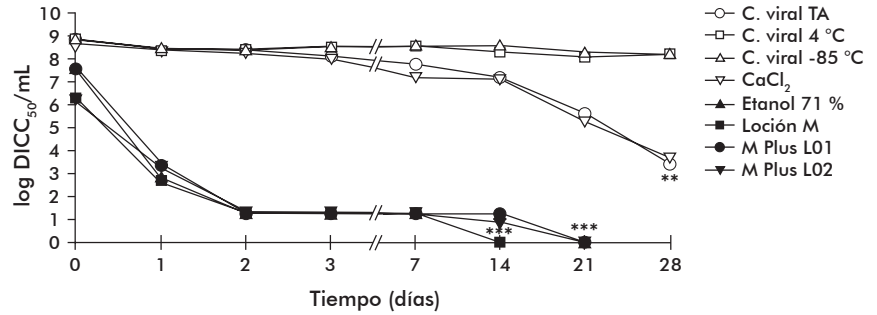


Figura 2. Cinética de inactivación virus no envueltos en el almacenamiento de la Melagenina® Plus (n = 3), con el uso del modelo del parvovirus canino. C. viral TA: control viral a temperatura ambiente; C. viral 4 °C: control viral a 4 °C; C. viral -85 °C: control viral a -85 °C; CaCl₂: cloruro de calcio 1 mg/mL; Loción M: Loción Melagenina®; M Plus L01: Melagenina® Plus Lote 01034; M Plus L02: Melagenina® Plus Lote 02003. Se indican los diferentes niveles de significación estadística (**p < 0.01, ***p < 0.001).

la capacidad de inactivación no se afectó por las variaciones de los parámetros de esta etapa (Tabla 5).

La baja resistencia de los modelos virales envueltos al etanol en las distintas etapas coincide con los estudios de validación viral de diferentes procesos de producción de preparados biológicos, la cual está estrechamente relacionada con las condiciones en que actúa el agente inactivante (naturaleza del medio, temperatura, humedad, pH) [7, 22, 23].

La acción virucida del etanol se ve afectada por la baja temperatura y la alta concentración de proteínas y lípidos: factores que tienden a estabilizar los virus y los hacen más resistentes a las condiciones adversas del medio y a la acción del desinfectante [7, 18, 22, 23]. Estos factores no están presentes en la etapa de almacenamiento del extracto placentario, lo cual favoreció la inactivación de todos los modelos virales utilizados en la validación del proceso de producción.

En resumen, la formulación de la Melagenina® Plus como solución alcohólica con una concentración mayor o igual al 71 % y su almacenamiento a temperatura ambiente permitió inactivar todos los modelos virales independientemente de la resistencia a los agentes inactivantes, y aportó un adecuado nivel de seguridad al proceso de producción de eliminar nuevas e impredecibles contaminaciones virales de las placentas.

Tabla 5. Factores de reducción de los modelos virales en el almacenamiento de los extractos placentarios de la loción Melagenina® y Melagenina® Plus[†]

Modelo viral ^a	Loción M L-01007		M Plus L-01034		M Plus L-02003	
	FR	Tiempo (días)	FR	Tiempo (días)	FR	Tiempo (días)
VIH-1 ^b	4.96	1	4.96	3	5.06	2
VDVB	3.50	2	3.44	2	3.61	1
VHP-1	4.32	1	4.21	1	4.27	1
PVC	6.35	14***	5.51	21***	6.09	21***

[†] Se muestran los valores promedio de tres réplicas para cada ensayo (intervalo de confianza del 95 %). El tiempo de inactivación del virus envuelto con respecto a los virus no envueltos fue altamente significativo (**p < 0.001).

^a Modelos virales: VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; VDVB: virus de la diarrea viral bovina; VHP-1: virus del herpes porcino tipo 1; PVC: parvovirus canino.

^b Título viral medio entre el cuantificado por efecto citopático y ELISA Ag p24.

Loción M: Loción Melagenina®.

M Plus: Melagenina® Plus.

FR: factor de reducción.

20. Ruibal Brunet IJ, Noa Romero E, Rivero Mas AT, Martín García RZ. Inactivación del VDVB (modelo experimental del virus de la hepatitis C) por pH bajo y tratamiento por calor en inmunoglobulinas humanas endovenosa. Sangre (Barc). 1999;44(5):352-6.

21. Pérez JR, Noa E, Vergel V, Alfaro E, Lovaina L, Sánchez Y, et al. Viral cleaning capacity of the manufacturing process of the EP-100. Avances en Biotecnología Moderna. 2007:CP-43.

22. Dichtelmüller HO, Germer M, Rudnick DC. A general approach to robustness studies for virus inactivating and partitioning steps used in production of plasma derivatives. Bioprocess Int. 2005;3(Suppl 7): 35-8.

23. Brorson K. Advances in viral clearance. In: Shukla AA, Etzel MR, Gadam S, editors. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007; p. 449-62.

Recibido en julio de 2010.

Aprobado en julio de 2012.