

Validación de técnicas analíticas para el control de calidad de productos medicinales de terapia avanzada.

Alejandro Ricaurte*, Luisa Duarte*, Bernardo Camacho, Gustavo Salguero.
 Unidad de Terapias Avanzadas, Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud -IDCBIS-, Bogotá, Colombia.
 *Contribución Igualitaria.

INTRODUCCIÓN

La implementación de metodologías analíticas para el control de calidad de productos medicinales de terapia avanzada como aquellos basados en células estromales mesenquimales (CEM) del cordón umbilical, es fundamental para el control del proceso de manufacturación y liberación del producto terminado. Dentro de los parámetros críticos de control de calidad de estos productos se encuentra la verificación de contaminación microbiológica a partir de la detección de *Mycoplasma spp*, la medición de niveles de endotoxina y la caracterización citogenética del producto celular. De este modo, en la Unidad de Terapias Avanzadas del IDCBIS se estandarizó y validó una técnica de PCR convencional para la detección de *Mycoplasma spp*, medición de endotoxinas y se estandarizó la fase preanalítica para el envío a estudio citogenético por bandejo G de diferentes lotes de CEM en diferentes estadios de producción, para así asegurar la calidad, estabilidad y reproducibilidad del producto biológico.

METODOLOGÍA

1. Detección de *Mycoplasma spp*.

Estandarización PCR Convencional.

Detección de cepas

M. arginini, *M. orale*,
M. hyorninis, *M. fermentans*, *M. genitalium*,
M. laidlawi, *M. hominis*,
M. pirum, *M. pneumoniae*,
M. salivarium,
M. urealyticum,
M. gallisepticum

Validación

Tipo de Muestra	n
Lisado Plaquetario (LPh)	5
Sobrenadante de CEM	10
DNA de CEM	10

1. Diseño de control positivo interno.

2. Cálculo de límite de detección.

3. Detección de control positivo externo (Aislamiento DNA de 6 cepas ATCC)

2. Detección de endotoxinas



Kinetic-QCL™ es un ensayo cinético y cuantitativo

Se mezcla la muestra con el reactivo LAL+ incubación

LPh, CEM, reactivos producción.
 Dil:100, 200, 400, 800.



Lectura cromogénica mediante Software.

Máxima dilución válida (MDV)

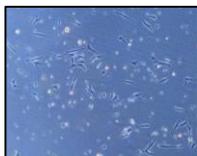
Límite de endotoxina (LímE)

Prueba de inhibición potenciación (%PPC)

3. Cariotipo bandejo G



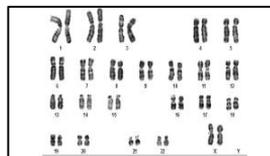
Siembra de CEM (n=57 donantes) e incubación a 37°C/ 24 horas



Visualización al microscopio (30% confluencia)



Envío a lab. externo (Incubación y análisis citogenético)



Recepción y Análisis del resultado

Validación de técnicas analíticas para el control de calidad de productos medicinales de terapia avanzada.

Alejandro Ricaurte*, Luisa Duarte*, Bernardo Camacho y Gustavo Salguero.
 Unidad de Terapias Avanzadas, Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud –IDCBIS-, Bogotá, Colombia.
 *Contribución Igualitaria.

RESULTADOS

1. Detección de Mycoplasma spp.

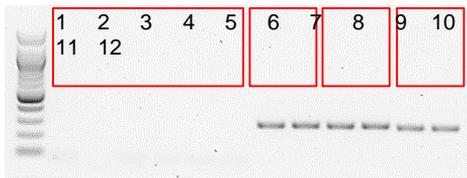
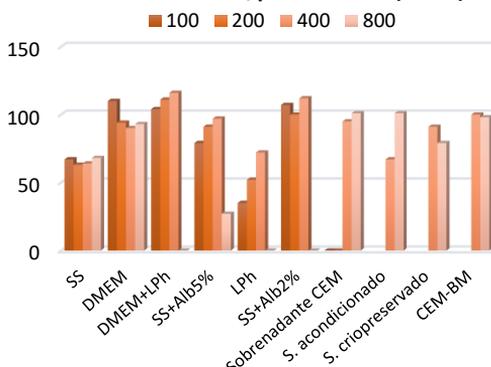


Imagen 1. Corrido electroforético para detección de Mycoplasma spp. En el carril 1 – 6 Se observan los resultados de muestras negativas. En los carriles 7 – 8 el resultado de una muestra positiva. Los carriles 9 – 10 Corresponden al control interno y los carriles 11 y 12 al control externo.

Prueba de inhibición/potenciación (%PPC)



Criterio Aceptabilidad: 50-200% - Dilución 1:400

3. Cariotipo bandeo G

El 9% (n=5) de 57 donantes de CEM enviadas, presentaron hallazgos cromosómicos de algún tipo.

Sexo	n=57 (%)	Anormalidades
FEMENINO	25 (44)	3 (12)
MASCULINO	27 (47)	2 (7)
INDETERMINADO	5 (9)	-

Copias de genoma en el estándar

Copias de genoma por reacción = $(1.000.000 / 100 \times 100) \times 5$ → Constante de trabajo

Volumen de rehidratación

Copias de genoma por reacción

Concentración de trabajo = $(50 / 5)$
(Copias de genoma/ μ l)

Volumen de plantilla

LOD= 10 Copias genoma/ μ l

% de concordancia muestras positivas

Número de muestras analizadas	19
Número de muestras concordantes	19
Número de mx no concordantes	0
Porcentaje de concordancia	100%
Criterio de aceptabilidad	80-100%

Tabla 1. Porcentaje de concordancia de las muestras positivas evaluadas en la validación.

% de concordancia muestras negativas

Número de muestras analizadas	6
Número de muestras concordantes	6
Número de mx no concordantes	0
Porcentaje de concordancia.	100%
Criterio de aceptabilidad	80-100%

Tabla 2. Porcentaje de concordancia de las muestras negativas evaluadas en la validación.

2. Detección de endotoxinas

LimE (EU/mL) = K (EU/Kg) IV / M

LimE (EU/mL) = 5,0 (EU/Kg) / (50 ml / 50 kg)

LimE (EU/mL) = 4,45 EU/ml

MDV = LimE/sensibilidad del cartucho.

MDV = 4,45 EU/ml / 0,005 EU/ml

MDV = 890

HALLAZGOS GENÉTICOS

46,XY,t(2;7)(p21;p15)[3]/46,XY[27]. Translocación

Se observa 22ps+. Heteromorfismo o variante normal

Se observa 15ps+. Heteromorfismo o variante normal

46,XX,inv(9)(p12q13). Inversión.

Se observa 2 metafases con trisomía 15

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se garantiza la validación de las técnicas empleadas en el control de calidad de los productos de terapias avanzadas y se avanza en el cumplimiento de estándares de buenas prácticas de manufactura, las cuales han demostrado cumplir con los estándares mínimos de calidad exigidos por entes de control internacionales.

La aplicación rutinaria de estos métodos en el proceso de manufacturación celular permitirá establecer criterios de liberación de producto que certifiquen su seguridad en la administración terapéutica en humanos.

REFERENCIAS

Capes-Davis, Amanda et al. 2010. "Check Your Cultures! A List of Cross- Contaminated or Misidentified Cell Lines." International journal of cancer 127(1):1–8.