

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

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 ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) 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

Biotechnología 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 ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) 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 inocuas 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 ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) [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 melanin 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 hemoderivados. 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 CVi: volumen y carga viral inicial de la muestra; V2 y CVf: 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, Dubé M, Castañeda F, *et al.* Desescalado del proceso de producción de Hebertrans® para su validación viral. Biotechnol 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

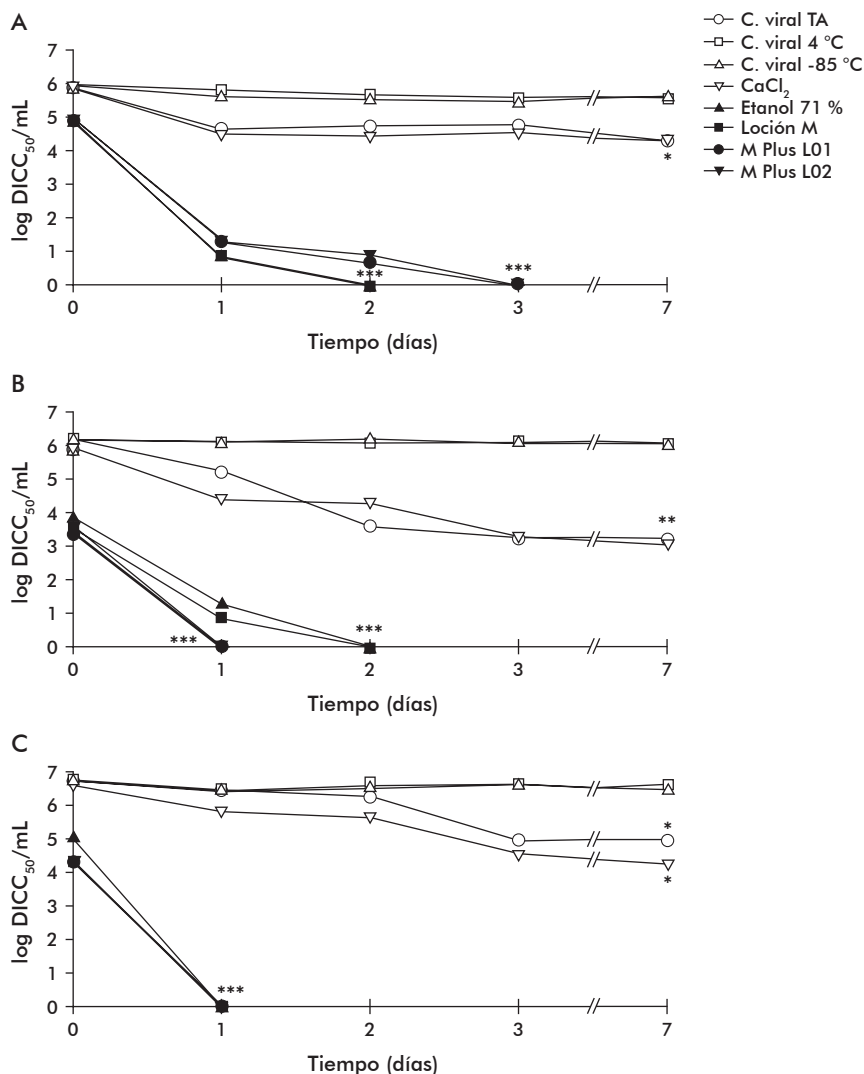


Figura 1. Cinética de inactivación de los modelos de virus envueltos: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (A), virus de la diarrea viral bovina (B) y virus del herpes porcino tipo 1 (C), durante el almacenamiento del extracto placentario ($n = 3$). C. viral TA: control viral a temperatura ambiente; 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 inactivación 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 VDB, 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

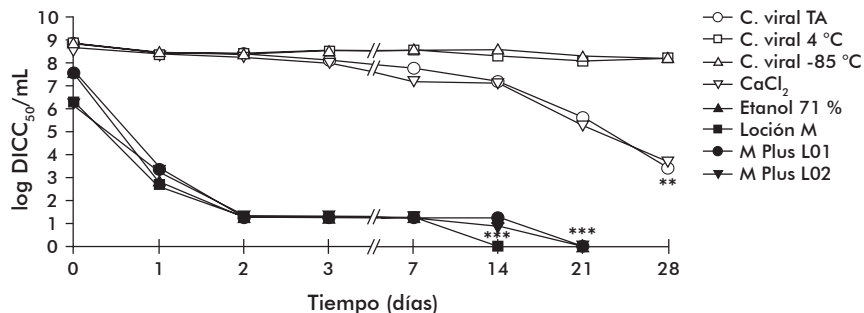


Figura 2. Cinética de inactivación virus no envueltos en el almacenamiento de la Melagenina® Plus ($n = 3$), con el uso del modelo del parvovirus canino. C. viral TA: control viral a temperatura ambiente; C. viral 4 °C: control viral a 4 °C; C. viral -85 °C: control viral a -85 °C; CaCl₂: cloruro de 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
VDB	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; VDB: 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 JJ, Noa Romero E, Rivero Mas AT, Martín García RZ. Inactivación del VDB (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, Gadani 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.

Viral inactivation capacity of Melagenina® Plus during the storage step

✉ 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

ABSTRACT

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 ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) 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

Biotechnología Aplicada 2013;30:51-56

RESUMEN

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

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 ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) 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

Introduction

Human placenta is an organ enriched on active and safe biological substances which are used to produce medicines and cosmetics. One of them is Melagenina® Plus, an internationally reknown pharmaceutical product used for the treatment of vitiligo, which is a dermatological disease affecting 1 % of the world population [1, 2].

Its biological origin forces the product to fulfill both national and international regulatory standards, (in Cuba from the State Center for Medicines Control, CECMED), and also suffice patients' needs.

Those regulations begin with the control during selection and testing of human placenta as raw material. This organ could be naturally infected by a wide range of DNA or RNA viruses [3-5], with an underlying risk for infectious agents transmission.

In order to circumvent limitations inherent to studying placenta (having to evaluate a wide range of

viral contaminants, the lag period of viral infections and the lower sensitivity assay levels required), the viral clearance capacity of the given production process needs to be evaluated. This guarantees the pharmaceutical's safety and diminishes chances for any virus from placenta (known or undiscovered, unexpectedly found or dangerous) to remain in the final formulation, being removed or inactivated [6, 7].

In the case of Melagenina® Plus, it is generated by adding calcium to the active pharmaceutical ingredient (API) of Melagenina® lotion. Previously, validation of the Melagenina® lotion manufacturing process demonstrated that this placental extract's safety was conditioned to its storage in ethanol (71 % or higher) and at room temperature ($30 \pm 5^\circ\text{C}$) [8].

Considering that the production processes of these two human placental extracts only differ in the addition of calcium to the API, this work was aimed at

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 melanin 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, Cateau 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.

verifying to what extent this change would impact the safety of the Melagenina® Plus regarding viral inactivation during the storage step.

Materials and methods

This research was performed in the AIDS Research laboratory (Lisida, Cuba), equipped with the necessary resources for the inverse scaling of the process and its validation. There were the proper qualified personnel from the Placenta Derivatives Plant (Deplacén, Cuba), and procedures complied with the standards recommended by the national and international regulatory agencies [3, 7, 9].

Sampling

Two lots of Melagenina® Plus were used in the study and one with the Melagenina® lotion as control. Class A ethanol (95 %) and calcium chloride dihydrate were purchased from Quimivita (Quimivita, S.A., Spain), and certified as released by the Quality Assurance Laboratory at Deplacén.

Simulated challenge study

Three flasks of each Melagenina® Plus and the Melagenina® lotion lots included in the study were taken. For each product, one flask was provided with RPMI-1640 culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS; 1:5 v/v), another with medium supplemented with FBS (1:10 v/v) and the third remained as control. All the samples were assayed in triplicates, identified with a code and further delivered to the Chemical Control Laboratory of the Quality Assurance Vice-Direction at Deplacén, for chemical, microbiological and biological control assays as established for industrial scale productions.

The melanocytopenic activity was determined by the methodology described by Martínez *et al.* [10]. Groups of three C57BL/6 male mice, with a weight of 20 to 22 g, were treated topically in the ears for five consecutive days. They received either lot of the product previously exposed to the treatments described, or the placebo (excipient without API). At 72 h of the last application, animals were sacrificed, ears epidermis samples were taken and processed by the L-Dopa histochemistry technique.

Viral models

Viral models were selected according to its similarity with the possible viral contaminants in the placentas, resistance to physical and chemical agents, and its relevance for being transmitted by blood and its derivatives.

They comprised enveloped and non-enveloped viruses, either RNA or DNA genome, respectively: 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) (Table 1).

The high-titer control strains were produced from the controlled cell lines at Lisida, and using culture media manufactured and released by the Cell Culture Laboratory at Lisida (Table 1). Each viral strain was amplified into its cellular specific substrate at a multiplicity of infection of 0.3.

Viral inoculums were titrated by the microtitration method in 96-well plates, according to Johnson and Byington [11]. The median tissue culture infective dose (TCID₅₀/mL) was determined as the cytopathic effect, according to the Reed and Muench method [12]. For the HIV-1, the p24 antigen was quantified using the DAVIH Ag p24 kit (Davihlab, Cuba).

Cytotoxicity study

The Melagenina® Plus, Melagenina® lotion, and the purified water solutions of 71 % alcohol and 1 mg/mL CaCl₂ were treated in triplicates to decrease its cytotoxicity on each cellular substrate. One volume of each sample was diluted in two and four volumes of a buffered salt solution (BSS), pH 7.2. Serial 1/4 dilutions were made, further adding the cellular substrates at the given concentrations: 5 × 10⁵ cells/mL for the cell line MT4, and 2 × 10⁵ cells/mL for the other cellular substrates. Dilutions were incubated at 37 °C in a wet atmosphere of 5 % CO₂. Four days later, cultures were observed under an inverted microscope and the lowest toxic dilution of samples were determined, compared to the cell culture controls without samples. The dilution showing moderate to minimum cytotoxicity was set as working dilution for sample processing.

Interference study

The viral models were added to cytotoxicity samples at the working dilution, and cells were further homogenized. Two samples of each were taken, one after mixing (M1) and a second (M2) after incubation for 1 h at room temperature. A control sample of each viral inoculum was included, being diluted in a supplemented medium and subjected to the same treatment. The assay was made in triplicates.

Subsequently, samples were processed according to results of the cytotoxicity study, with serial dilutions similar to those used to titrate viral inoculums.

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.

Table 1. Viral models selected for the validation study

Viral model ^a	Genome / Enveloping	Size (nm)	Cellular substrate / Culture media	Resistance to Inactivation	Viral types
HIV-1	RNA / enveloped	80 - 100	MT4 / RPMI-1640	Low	Human retroviruses
BVDV	RNA / enveloped	45 - 60	MDBK / MEM	Moderate	Hepatitis C virus and enveloped RNA viruses
PHV-1	DNA / enveloped	150 - 200	Vero C-1008 / MEM	Low to moderate	Hepatitis B virus and enveloped DNA virus
CPV	DNA / non-enveloped	18 - 26	LFBC / MEM	Very high	Parvovirus B19, hepatitis A virus, non-enveloped DNA and RNA viruses

^a Viral models: HIV-1: human immunodeficiency virus type 1 (strain IIIB); BVDV: bovine viral diarrhea virus (strain NADL); PHV-1: porcine herpes virus type 1 (Stendal strain); CPV: canine parvovirus (native strain No. 7164).

MT4: human T-cells line transformed by co-culture with lymphocytes carrying HTLV-1.

MDBK: bovine kidney cell line.

Vero C-1008: green monkey (Sabaeus monkey) kidney cell line (clone 1008).

LFBC: línea celular de fibroblasto de curiel.

Viral interference was set as the viral titer reduced more than two logs.

Inactivation during storage of Melagenina® Plus

For the challenge at the storage step, a flask from each selected Melagenina® Plus lot was selected. These represents the 0.03 % of the flasks conforming an industrial lot, which were infected with the viral models at a proportion of 1:5 or 1:10 (v/v) according to the simulated challenge study results. Immediately after the addition of each viral model to the flask, a sample was taken, considering it as the initial viral load (VL_i), and flasks were stored at room temperature.

The inactivation kinetics was determined for enveloped viruses monitoring on days 1, 2, 3 and 7 of storage. The VL assessed on day seven was considered as the final VL (VL_f). The study was carried out in triplicates.

The following controls were included:

- Viral strain in 1 mg/mL CaCl₂ and in 71 % ethanol, both prepared with purified water.
- Viral strain in supplemented culture media (stored at room temperature, 4 and -85 °C).
- A flask of Melagenina® lotion, to check if the precipitate observed in the Melagenina® Plus once added the CaCl₂ had any incidence in the inactivation property at storage.

Control samples were kept at the same storage temperature of Melagenina® Plus and VLs were quantified at the same time intervals.

Reduction factor calculation

Reduction factor (RF) at storage was calculated according to the following equation [9, 12]:

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

Where:

V₁ and VL_i are the initial volume and viral load of the sample; V₂ and VL_f are the final volume and viral load of the sample.

The process step was classified as effective, moderately effective or ineffective, according to the viral reduction logarithms guidance of the Committee for Proprietary Medicinal Products [9].

Statistical analysis

Viral challenge results were analyzed with the aid of the Statgraphics Plus program, (Statpoint Technologies, Inc., USA; version 5.0, 2000). A Student's t-test was used for paired data, to identify statistically significant differences between VL_i and VL values at different time intervals for each viral model.

Results and discussion

Simulated challenge

Addition of the supplemented media, at a proportion of 1:5 (v/v), to the Melagenina® Plus and the Melagenina® lotion, significantly modified (p < 0.01) several quality parameters of these products, such as: ethanol concentration, absorption, cholesterol, nitrogen and proteins concentrations. Therefore, they were not accepted, and the viral challenge was not carried out with that proportion of supplemented media.

When the medium was added at half the proportion 1:10 (v/v), some physicochemical parameters were altered, but not significantly: absorption, evaporation residues, cholesterol, nitrogen and protein concentrations (Table 2). Lipids concentration remained within the established acceptance limits. This parameter was regarded as essential for the melanocytopenic activity of placental extracts [2, 13].

Melagenina® Plus diluted 1:10 (v/v) in culture medium showed no significantly different biological activity in mice melanocytes, compared to animals treated either with Melagenina® or the control lot of the product (Table 2). Therefore, these results were accepted, and the 1:10 (v/v) medium proportion was set for viral challenge at storage.

Key aspects are considered in the viral validation study: the proper design of the production process at laboratory scale and results from the simulated challenge, to demonstrate the influence of the culture media used to dilute infectious agents on the physicochemical and biological parameters established for the product [14-16].

Cytotoxicity study

Samples' cytotoxicity were mild to moderate (Table 3), with samples diluted 1:2 (v/v) in BSS showing mild to moderate cytotoxicity, while those diluted 1:5 (v/v) showed minimal changes at best in cell cultures. No differences were observed neither between the two

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.

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.

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.

Table 2. Results from the quality control of the Melagenina® lotion and the Melagenina® Plus lots in the simulated challenge study at the storage step*

Product	Flask ^a	pH	Alcohol (%)	Density (g/mL)	Minimum absorption (UA)	Maximum absorption (UA)	Evaporation residues (g/100 mL)	α amino acids (mg/100 mL)	Cholesterol (mg/100 mL)	Lipids (mg/100 mL)	Nitrogen (mg/100 mL)	Proteins (mg/100 mL)	Calcium concentration (mg/100 mL)
Melagenina® lotion 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 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

* Values represent means of three replicates per flask. All assayed conditions fulfilled organoleptic properties' standards and showed significant differences in the biological activity assay.

^a Flask 1: control; Flask 2: media 1:10 (v/v); ^b altered parameter. nd: not determined; np: does not proceed.

lots of Melagenina® Plus nor of any of them to the one of Melagenina® lotion. Such results were determinant for the selection of the 1:2 (v/v) BSS dilution as the procedure to decrease samples' cytotoxicity.

Several methods have been reported to decrease cytotoxicity (dialysis, gel filtration chromatography, precipitation and serial dilutions); but either the method, special care must be taken to do not deteriorate viral titers, which is detrimental for detecting low VLs [9, 15, 16].

Viral interference study

Viral interference was determined by decreasing or not of the viral models titer in samples, in comparison with the control models (Table 4). The titer decrease for viral controls diluted 1:10 (v/v) in supplemented culture medium did not achieved 1 log.

When adding the enveloped virus models to placental extracts, a fast decrease in viral titers of 2 or more logs was observed, significantly different from the viral control ($p < 0.05$). After 1 hour of incubation, baseline VLs were detected, with highly significant differences ($p < 0.01$). A very similar behavior was observed for the viral control dissolved in 71 % ethanol solution (Table 4). No significant differences were detected between CPV viral titers, regardless ethanol.

These results are in agreement with those from other groups, reporting a marked susceptibility of enveloped viruses to lipidic solvents, and particularly to alcohol concentrations higher than 70 %, but not of the non-enveloped viruses [6, 17, 18].

These results demonstrate that placental extracts do not interfere in the replication of these viral models. The viral interference study provided evidences on the action of the raw materials and the biological products over the viral models' titers, as well as the selection of adequate viral models to study the viral clearance capacity of the Melagenina® Plus production process.

Viral inactivation capacity of Melagenina® Plus during storage

The behavior of enveloped model viruses during the storage of Melagenina® Plus are shown in figure 1. There were no statistically significant differences among viral titers for both lots of Melagenina® Plus and the controls used in the study (Melagenina® lotion and 71 % ethanol solution). Significant differences ($p < 0.05$) were found in VL_i for samples containing 71 % ethanol compared to viral controls, in agreement with results from the viral interference study.

The three viral models followed the typical viral behavior seen for viruses of low resistance to organic solvents, characterized by a sharp drop of titers and complete inactivation within a short period. This last property is related to their relative ethanol resistance. In all the cases, very highly significant differences were detected between VL_i and VL assessed after 24 h ($p < 0.001$) (Figure 1).

PHV-1 was completely inactivated in both infected placenta extracts during the first 24 h of storage, and also in the 71 % alcohol solution (Figure 1). RNA viruses showed a more delayed inactivation, for HIV-1 achieved after 24-48 h of storage with the Melagenina® lotion and 48-72 h after storage with both lots of Melagenina® Plus.

Table 3. Results from the cytotoxicity study for samples further challenged in the cellular substrates*

Samples	Dilution in BSS	Toxicity in the cellular substrates			
		MT4	Vero 1008	MDBK	LFBC
CaCl ₂ (1 mg/mL)	1:2	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
	1:4	Non toxic	Non toxic	Non toxic	Non toxic
Ethanol 71 %	1:2	Mild	Mild	Mild	Mild
	1:4	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
Melagenina® lotion L-01007	1:2	Mild	Mild	Mild	Mild
	1:4	Minimal	Mild	Minimal	Non toxic
Melagenina® Plus L-01034	1:2	Mild	Moderate	Mild	Mild
	1:4	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal
Melagenina® Plus L-02003	1:2	Moderate	Moderate	Mild	Mild
	1:4	Minimal	Minimal	Minimal	Minimal

* Results represent the mean behavior of three replicates per dilution. Toxicity is expressed for each dilution (v/v) of the viral titration system: minimal (1:4), mild (1:16), moderated (1:64) or high (1:256).

SBS: Balanced salt solution.

MT4: human T-cell line transformed by co-culture with lymphocytes carrying HTLV-1.

Vero C-1008: green monkey (Sabaeus monkey) kidney cell line (clone 1008).

MDBK: bovine kidneys cell line.

LFBC: hamster fibroblast cell line.

BVDV showed an intermediate inactivation progression, achieved within the first 24 h of storage with the Melagenina® Plus and after 48 h of storage in Melagenina® lotion and 71 % alcohol. None of the three enveloped virus models showed significant differences in VL compared to controls at any time points.

In the case of BVDV, it is affected by lipid solvents and chemical detergents, but tends to stabilize with the addition of proteins [15, 19]. Nevertheless, the BVDV inactivation observed was not related to the amount of lipid precipitates in the placental extracts, due to the short storage periods assayed.

There were differences in the titers of enveloped virus controls stored at different temperatures. Viral titers decreased in those stored at room temperature, but not at 4 or -85 °C (Figure 1). For HIV-1, viral titer showed statistically significant differences ($p < 0.05$) only after seven days of storage at room temperature, compared to the titer of the viral control stored at 4 °C. Such differences were detected for PHV-1 since the third day ($p < 0.05$) and maintained until the seventh. Differences were detected earlier for BVDV, starting at 24 h after storage at room temperature ($p < 0.05$).

Table 4. Results from the study of viral interference for placental extracts, for viral models used in viral validation†

Viral model ^a	Viral control (1:10) ^b		Ethanol 71 %		Lotion 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

† Values are presented as mean of three replicates for each assay, together with the statistic significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

^a Viral models: HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; BVDV: bovine viral diarrhea virus; PHV-1: porcine herpes virus type 1; CPV: canine parvovirus.

^b Data expressed in log TCID₅₀/mL.

^c Mean viral titer over the quantified by cytopathic effect and ELISA Ag p24.

Lotion M: Melagenina® lotion.

M Plus: Melagenina® Plus.

M1: sample homogenized just after the addition of each viral model to each cellular substrate, at the dilution determined in the simulated challenge study; M2: sample taken after the incubation of the viral model with the cellular substrate for 1 h at room temperature.

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.

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.

20. Ruibal Brunet JJ, 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.

and becoming highly significant at 48 h ($p < 0.01$) and sustained until day seven.

Similar results were reported by Ruibal *et al.* [20], while validating an intravenous immunoglobulin production process. They observed a drop in BVDV titers below 6 logs when stored at 21 °C for 21 days, while storage at 4 °C did not affect titers.

The decrease of viral titers for controls stored at room vs. low temperature demonstrated that room temperature storage reinforces the virus inactivation capacity of the product.

The inactivation kinetics of viral models in CaCl_2 did not differ from the viral control at room temperature, except for the statistically significant differences ($p < 0.05$) detected for PHV-1 (Figure 1). This indicates that the drop in viral titers was caused by the storage temperature.

The inactivation kinetics for the non-enveloped virus model (CPV) is shown in figure 2. After 24 h of storage, a highly significant drop in viral titers was detected for all the samples in 71 % alcohol, compared to the respective VL_1 values. The VL values stabilized borderline to the detection limit of the assay after 48 h, and remained steady until day seven, with very highly significant differences ($p < 0.001$). This viral model was fully inactivated in the Melagenina® lotion on day 14, and after 21 days in both lots of Melagenina® Plus and 71 % alcohol (Figure 2).

Titers of controls stored at 4 and -85 °C remained as initially determined during the whole experiment. They dropped for the room temperature storage since day seven, becoming progressively significant on day 14, highly significant on day 21 and very highly significant on day 28 ($p < 0.001$), this last accounting for a 5.41 logs decrease.

The CPV inactivation kinetics in 1 mg/mL CaCl_2 behaved very similar to the viral control stored at room temperature, evidencing the lack of inactivating capacity for CaCl_2 at the assayed concentration and reinforcing the conclusion that temperature was the key parameter leading to virus inactivation.

All these results corroborate the effectiveness of the experimental design to study the capacity for viral inactivation during storage of the production process of the placental extract Melagenina®. In fact, enveloped viruses were inactivated within a short period (24 h), with the non-enveloped CPV showing a marginal VL at 72 h of storage [7].

Since CPV, a highly resistant virus, was completely inactivated upon storage, safety was increased both for Melagenina® Plus and its production process. Therefore, CPV results could not be considered relevant just for the non-enveloped viruses, but also this virus can be regarded as a non-specific viral model which provides evidences for the inactivation of new or unpredicted viral contamination in raw materials [7, 9, 15].

Table 5 shows RFs of both placental extracts upon storage, and their respective times for inactivating the challenge VLs. Consequently, enveloped virus were quickly inactivated, after three and four days of storage for Melagenina® Plus and Melagenina® lotion, respectively, without significant differences. The non-enveloped viral model was inactivated after 14 and 21 days of storage for Melagenina® and Melagenina®

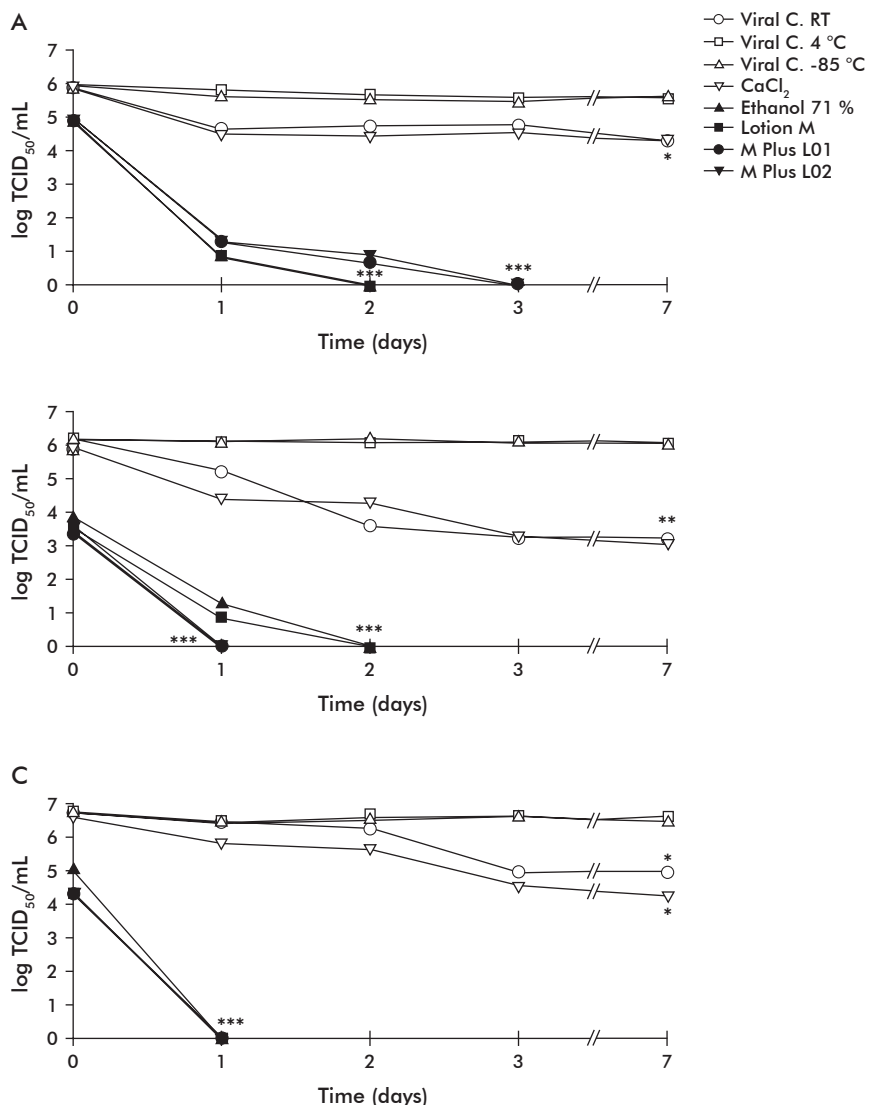


Figure 1. Inactivation kinetics of the enveloped virus models: human immunodeficiency virus type 1 (A); bovine viral diarrhea virus (B) and porcine herpes virus type 1 (C) during the storage of the placental extract ($n = 3$). Viral C. RT: viral control at room temperature; Viral C. 4 °C: viral control at 4 °C; Viral C. -85 °C: viral control at -85 °C; CaCl_2 : 1 mg/mL calcium chloride; Lotion M: Melagenina® lotion; M Plus L01: Melagenina® Plus lot 01034; M Plus L02: Melagenina® Plus lot 02003. Statistically significant differences are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

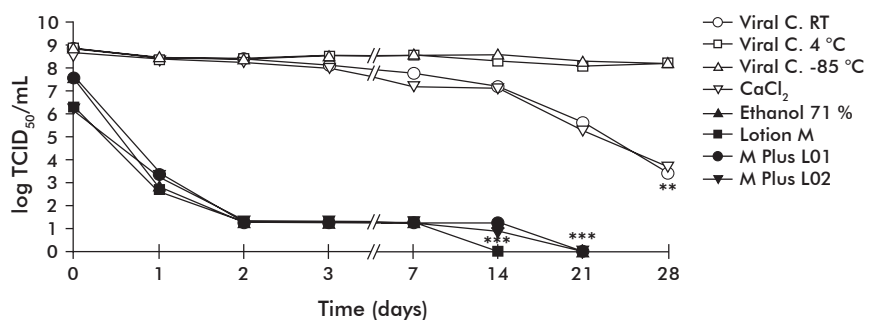


Figure 2. Inactivation kinetics of the non-enveloped CPV model virus in Melagenina® Plus at storage ($n = 3$). Viral C. RT: viral control at room temperature; Viral C. 4 °C: viral control at 4 °C; Viral C. -85 °C: viral control at -85 °C; CaCl_2 : 1 mg/mL calcium chloride; Lotion M: Melagenina® lotion; M Plus L01: Melagenina® Plus, lot 01034; M Plus L02: Melagenina® Plus, lot 02003. Statistically significant differences are indicated (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Plus, respectively, with very highly significant differences ($p < 0.001$) for each placental extract.

Very highly significant differences ($p < 0.0001$) were observed between the times for inactivation of enveloped and non-enveloped viruses. The difference on time required for viral inactivation in both placental extracts of Melagenina® Plus was related to the presence of greater amounts of lipid precipitates, which could form lattices that protect viruses from the action of the inactivating agent, and, therefore, increase the time required for full inactivation.

Very similar results were observed when validating the placental extract EP-100 with the enveloped virus models, but not for the non-enveloped viruses. These last required a longer storage period (63 days) for complete inactivation [21]. It was related to the storage temperature (4 °C) and the ethanol concentration in the EP-100 extract. That results corroborate that these two factors are fundamental for the safety of the Melagenina® Plus placental extract.

FRs higher than 4 logs were attained except for the BVDV, and the four viral models were effectively inactivated during the storage step of Melagenina® Plus. The challenge VLs of either enveloped or non-enveloped viruses were fully inactivated, regardless variations in the parameters for this step (Table 5).

The low resistance of the enveloped model viruses to ethanol at the different steps matches that of viral validation studies of different processes for biologicals' production, being closely related to the conditions for the action of the inactivating agent (medium properties, temperature, humidity and pH) [7, 22, 23].

Received in July, 2010.

Accepted in July, 2012.

Table 5. Reduction factors of viral models upon storage of placental extracts of Melagenina® lotion and Melagenina® Plus[†]

Viral models ^a	Lotion M L-01007		M Plus L-01034		M Plus L-02003	
	RF	Time (days)	RF	Time (days)	RF	Time (days)
HIV-1 ^b	4.96	1	4.96	3	5.06	2
BVDV	3.50	2	3.44	2	3.61	1
PHV-1	4.32	1	4.21	1	4.27	1
CPV	6.35	14***	5.51	21***	6.09	21***

[†] Values are presented as the mean of three replicates per assay. Inactivation time of the non-enveloped virus was very highly significant (***) $p < 0.001$.

^a Viral models: HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; BVDV: bovine viral diarrhea virus; PHV-1: porcine herpes virus type 1; CPV: canine parvovirus.

^b Mean viral titer for values calculated by the cytopathic effect method and the p24 Ag ELISA.

Lotion M: Melagenina® lotion.

M Plus: Melagenina® Plus.

RF: Reduction factor.

The virucidal action of ethanol is affected by low temperature and high protein and lipid concentrations, these factors stabilizing viruses and making them more resistant to the adverse conditions of the culture medium and disinfectants [7, 18, 22, 23]. Both culture medium and ethanol were absent during placental extract storage, favoring the inactivation of all the viral models while validating the production process.

In summary, the Melagenina® Plus formulation in alcohol solution of 71 % or higher, together with its storage at room temperature, supported the complete inactivation of all the viral models tested, regardless its resistance to inactivating agents. It provided an adequate safety level to the production process, being able of eliminating new or unpredictable viral contaminations of placentas.

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.