



# DESAFÍOS EN LAS TERAPIAS CELULARES Y GÉNICAS

El objetivo de las terapias celulares y génicas es incidir en el origen de las enfermedades, para obtener tratamientos individualizados prometedores y la posibilidad de dar solución a enfermedades previamente intratables.



MARIA RIFÉ SOLER,  
PhD, Product Manager Biotechnology en Werfen.

El aumento tanto en la investigación en este tipo de terapias, como en el número de las que se aprueban y entran en ensayos clínicos, subraya su enorme potencial en tratamientos que pueden salvar la vida a millones de personas. No obstante, su complejidad adyacente y su desarrollo requieren del cumplimiento de altos estándares de calidad siguiendo buenas prácticas de fabricación (BPF), que tienen como objetivo la disminución de riesgos y permitir una dosificación segura y eficaz durante los estudios clínicos y el cuidado del paciente.

## Las limitaciones de la PCR cuantitativa

A lo largo de todo el proceso de biofabricación, es preciso identificar y mitigar el riesgo de contaminación para aumentar la efectividad terapéutica y garantizar la seguridad del paciente.

La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica muy utilizada para este fin debido a su facilidad de uso. Esta metodología utiliza estándares de ADN de concentración conocida para trazar una curva estándar a partir de la cual se extrapolan las concentraciones de las muestras testadas. La necesidad de curvas estándar plantea desafíos:

(1) La qPCR es una técnica muy sensible a los inhibidores que pueden interferir durante la reacción y dificultar la eficiencia de amplificación. Es muy difícil encontrar estándares que amplifiquen de forma similar a la diana que se desea detectar en estas condiciones.

(2) Para la cuantificación precisa y la monitorización de la degradación de los propios estándares, es necesario el uso de una metodología complementaria (normalmente espectrofotometría).

Cualquier variación en la concentración de los estándares se plasma en los resultados de las concentraciones

estimadas de las muestras testadas. Por lo tanto, el uso de curvas estándar genera variabilidad y sesgo en los resultados.

Por otro lado, en comparación con otro tipo de productos farmacéuticos más convencionales, la cantidad de producto disponible para los ensayos de control de calidad es muy limitada y tiene una vida útil muy corta.

Hasta hace poco tiempo, la qPCR ha sido considerada la técnica de referencia (Gold standard) para la detección de impurezas en procesos o productos durante el desarrollo de terapias celulares y génicas. Con esta técnica se pueden obtener resultados en un solo día, pero estos dependen de la interpolación de las muestras a unas curvas estándar que pueden incluir una gran variabilidad intrínseca.

Si bien, en su momento, se consideró que la qPCR era una mejora con respecto a los ensayos anteriores basados en cultivos celulares, todavía no se trata de una técnica suficientemente sensible.

## La PCR digital eleva el control de calidad al siguiente nivel

Los organismos reguladores para el desarrollo de terapias celulares y génicas han reconocido la necesidad de utilizar nuevos enfoques y la industria está respondiendo con innovaciones analíticas como la PCR digital.

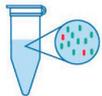
La PCR digital (dPCR) proporciona una cuantificación absoluta con una exactitud y precisión muy altas comparadas con las que ofrece la qPCR.

El fundamento de la dPCR es la división de la mezcla de la reacción inicial en miles de particiones en las que la muestra y los reactivos necesarios para la amplificación se distribuyen al azar. De esta forma, las moléculas diana

# Terapia celular y génica

se reparten y, en vez de amplificarse en un único tubo, se darán miles de reacciones de amplificación de forma independiente.

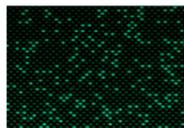
La división inicial de la reacción disminuye el efecto de posibles inhibidores en la capacidad de amplificación de la muestra.



Red - Target and Green - Background (gDNA, cDNA; primers/probes; master mix)



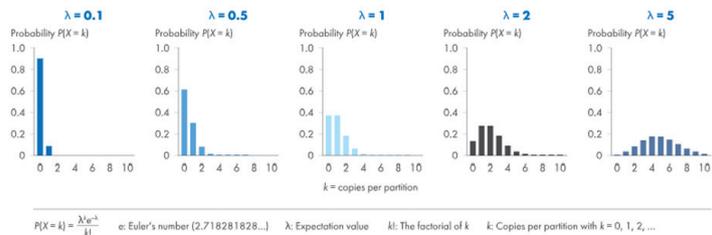
Random distribution of molecules into partitions



Absolute quantification: Copies/ $\mu$ l

La detección de las particiones positivas se realiza a punto final gracias a la señal fluorescente de sondas de ADN específicas o de un agente intercalante. La cuantificación de las particiones positivas y negativas, la aplicación de la estadística de Poisson para corregir la posible presencia de dianas múltiples en una partición y la aplicación del volumen de muestra analizado, permiten

calcular la concentración absoluta de esta muestra sin necesidad de cuantificar estándares e interpolar los resultados.



La PCR digital ofrece mejoras muy importantes respecto a la qPCR:

- Cuantificación absoluta.
- Alta tolerancia a inhibidores.
- Alta precisión.
- Alta sensibilidad para detectar eventos muy poco frecuentes.
- Alta reproducibilidad de los estudios clínicos y el cuidado del paciente.

## PCR digital QIAcuity® Making Digital Easy.

werfen



**Cuantificación absoluta**

Sin necesidad de incluir curvas estándar.



**Sistema integrado**

Partición, amplificación y lectura en un único instrumento



**Escalable**

Formato de placas e instrumentos según necesidades

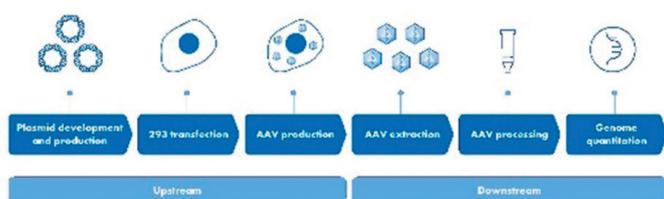


### Sistema de PCR digital QIAcuity®

El QIAcuity es un sistema de PCR digital totalmente automatizado que requiere muy poco trabajo manual. Permite la carga continua de distintas placas, incluso con distintos ensayos cada uno, hasta 5-plex. Incluye un software para el análisis de los resultados específicamente por aplicación.

## Eliminación de los riesgos en las terapias celulares y génicas

Las terapias celulares y génicas llevan inherente la posibilidad de contaminación por distintas fuentes como el ADN residual de la célula huésped, los micoplasmas o la presencia de otros microorganismos.



### ADN residual de la célula huésped

Las terapias génicas utilizan frecuentemente vectores víricos por su eficiencia en la introducción de genes terapéuticos en células huésped que estos virus recombinantes utilizan para replicarse.

Aunque se pueden utilizar vectores derivados de distintos virus, las terapias génicas basadas en el uso de Virus Adeno-Asociados (AAV) son las más comunes actualmente. La bioproducción terapéutica con AAV implica la transfección de células huésped que serán el motor para la replicación del vector vírico en su interior.

Al final del proceso, la lisis celular y la posterior purificación del vector vírico tienen que garantizar la eliminación del ADN residual de la célula huésped (resDNA), que suele ser arrastrado. Este proceso plantea problemas de seguridad importantes como la posibilidad de crear oncogenicidad, infectividad e inmunogenicidad.

Las directivas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen límites en las cantidades de ADN residual que los fabricantes de productos bioterapéuticos deben cumplir: menos de 10 ng por dosis y un tamaño del ADN menor de 200 pares de bases.

Algunos sistemas de dPCR pueden llegar a cuantificar resDNA a nivel de femtogramos en una única reacción, incluso en presencia de contaminantes o inhibidores en la mezcla.

La fragmentación del ADN huésped dificulta su detección. No obstante, la posibilidad de realizar ensayos multiplex con la dPCR garantiza que los resultados no se vean afectados por esta fragmentación.

Además, existen protocolos de trabajo que no requieren digestión ni purificación, reduciendo mucho el tiempo de realización.

### Los micoplasmas

Los micoplasmas son un contaminante muy común en cultivos celulares. Se calcula que 1 de cada 3 cultivos celulares están contaminados por esta bacteria, difícil de detectar y resistente a antibióticos.

Las distintas especies de Mycoplasma, pueden perjudicar el proceso de producción en terapias génicas. Por ejemplo, a nivel del metabolismo de la célula huésped, introduciendo variabilidad durante el proceso de producción e incluso malignidad celular, o de la patogenicidad directa en humanos.

### Otros microorganismos

Las terapias celulares y génicas son incompatibles con procesos de producción estériles por su uso de células vivas. Su producción en condiciones asépticas tiene que incluir también la detección del riesgo de contaminación microbiana.

Por esta razón, existen ensayos de dPCR multiplex específicos para la detección de la cantidad total de microorganismos viables, no solo en el producto final dirigido al paciente, sino también en la materia prima, los dispositivos, los contenedores y las muestras en distintos estadios del proceso de fabricación.

### Pensar en soluciones de principio a fin

Si bien los fabricantes están haciendo grandes pasos en el descubrimiento de nuevas terapias, cualquier contaminación puede poner en riesgo la seguridad de un lote. Mantener sus productos libres de contaminantes e impurezas continúa siendo una prioridad.

La dPCR se está convirtiendo cada vez más en la tecnología preferida para la fabricación de terapias celulares y génicas seguras y eficaces.

### Referencias:

1. Mao X, Liu C, Tong H, Chen Y, Liu K. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am J Transl Res.* 2019; 11(12):7209–7222.
2. De AA Morley. Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif.* 2014; 1(1):1–2.
3. Hayes DB, Dobnik D.J. Commentary: Multiplex dPCR and SV-AUC are Promising Assays to Robustly Monitor the Critical Quality Attribute of AAV Drug Product Integrity. *Pharm Sci.* 2022 Aug;111(8):2143-2148.
4. Sykes PJ et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques.* 1992; 13:444–449.