

EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA

Fernando Fernández,¹ Marisela Suárez,² Wilfredo Díaz,²
Haydée Gerónimo,² Fernando Porrero² y Celia Fernández-Ortega²

¹Banco de Sangre Provincial "Renato Guitart". Apartado postal 1040, Santiago de Cuba, Cuba.

²Centro de Investigaciones Biológicas. Apartado postal 6996, Ciudad de La Habana, Cuba.

Tel: (53-7) 21 7465; Fax: (53-7) 21 0553; E-mail: prod@cib.cigb.edu.cu

ABSTRACT

The influence of pasteurization on some physical-chemical and biological properties of the human transfer factor was studied. Results did not show significant changes in protein concentration, pH, UV spectrum and absorbance (260/280 nm) after the virucidal procedure. Leukocyte inhibitory factor stimulation was maintained after the pasteurization in all tested batches.

Key words: pasteurization, virucidal procedure, transfer factor, validation

Biocología Aplicada 1998;15:22-24

RESUMEN

Se estudió la influencia de la pasteurización sobre algunas propiedades químico-físicas y biológicas del factor de transferencia humano. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la concentración proteica, pH, espectro de absorción UV y absorbancia (260/280 nm) después del procedimiento virucida. La estimulación del factor inhibitorio de la migración leucocitaria se mantuvo presente después del proceso de pasteurización en todos los lotes estudiados.

Palabras claves: pasteurización, procedimiento viral, factor de transferencia, validación

Introducción

En Cuba se ha aplicado con éxito el extracto dializable de leucocitos humanos (EDL) con actividad de factor de transferencia (FT) en el tratamiento de herpes simple (1) y herpes zóster (2), de asma (3, 4), de cáncer de ovario (5) y de leucemias agudas (6). Se ha reportado también eficacia de este medicamento en el incremento de la supervivencia de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (7, 8); además, para este producto se ha encontrado actividad anti-VIH *in vitro* (9).

Este fármaco se obtiene a partir de leucocitos que produjeron interferón (IFN) (10), de manera que, si bien los progresos en la selección de donantes y la introducción de métodos cada vez más sensibles de detección de agentes virales ofrecen un determinado margen de seguridad a los hemoderivados, se conoce que pudieran presentarse partículas infectivas en concentraciones inferiores a las detectables por las técnicas habitualmente utilizadas, además de que cualquier nueva entidad infecciosa pasará "silenciosa" ante estos análisis (11). En la producción de FT, la posibilidad de contaminación viral está presente debido al empleo de mezclas de hasta 6 000 concentrados de leucocitos.

En la actualidad se han desarrollado y descrito varios métodos de inactivación/eliminación de virus en la producción de biológicos, y uno de los más efectivos es el calentamiento en solución a 60 °C durante 10 h (pasteurización). Con este proceso se han re-

portado disminuciones de más de 5,6 log de dosis infectiva media (ID₅₀) para virus de hepatitis B, más de 5,5 log ID₅₀ para virus de hepatitis C y más de 6 log ID₅₀ para VIH en las producciones de albúmina e inmunoglobulinas (12). También se reporta con esta técnica la reducción de más de 4 log ID₅₀ de VIH en la elaboración de Factor VIII concentrado (13), así como 7 log ID₅₀ de VIH-1 y 5,5 log ID₅₀ de Sindbis virus para el proceso de obtención de Antitrombina III (14). Sin embargo, esta metodología tiene el inconveniente de que sólo puede aplicarse si se demuestra que no provoca afectaciones en el producto que alteren sus propiedades químico-físicas y biológicas. En el presente trabajo se estudia el efecto de la pasteurización en el FT, con vistas a su posible utilización como paso de inactivación viral en la producción de este medicamento.

Materiales y Métodos

Preparación del FT

Para la realización de los estudios propuestos se emplearon 5 lotes de FT preparados de leucocitos purificados de aproximadamente 6 000 donaciones de diferentes individuos. Los glóbulos blancos habían sido previamente inducidos a producir IFN alfa natural (15). El factor de transferencia se obtuvo lisando las células mediante ciclos de congelaciones-

1. González E, Díaz de La Rocha A, Sagaró B, Fernández-Ortega C. Valor terapéutico del factor de transferencia en el herpes simple. Estudio a doble ciegos. *Biocología Aplicada* 1993;10(1):3-4.

2. Cabezas-Quiroga R, Estrada Parra S, Padierna L, Padierna J, Fernández C, López P. Inmunoterapia con factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Biocología Aplicada* 1990; 7(1):52-57.

3. Jiménez JC, Di Prisco MC, López-Saura P. Therapeutic effects of transfer factor in patients with extrinsic bronchial asthma. *Biocología Aplicada* 1993; 10(1):1-2.

4. Di Prisco MC, Jiménez JC, López-Saura P. Clinical and immunological evaluation of asthmatic patients in a double blind treatment protocol with transfer factor. *Biocología Aplicada* 1995;12(1):16-22.

5. Díaz D, Pérez M, Pla L, Bernal J, Infante M, Milán M, Pascual M. Terapia intercalo con interferón alfa, gamma recombinante y factor de transferencia en el cáncer de ovario. *Biocología Aplicada* 1995;2(3):192-193.

6. Fernández O, Díaz N, Morales E, Toledo J, Hernández E, Rojas S, Madrid X, López-Saura P. Effect of transfer factor on myelosuppression and related morbidity induced by chemotherapy in acute leukaemias. *Biocología Aplicada* 1995;12(3):187-188.

descongelaciones sucesivas y ultrasonido. Después de dicho tratamiento se obtuvo una pasta que fue dializada durante 24 h contra tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, a través de membranas (Gallenkap) de 10 000 Da de exclusión molecular (10). Se consideró como una unidad (1 U) de FT el producto resultante de la diálisis de 5×10^8 leucocitos.

Pasteurización

Se tomaron 50 mL de cada dializado y se calentaron durante 10 h a 60 °C, definiéndose el tiempo cero a partir de que el producto alcanzó la temperatura de pasteurización. Luego, el material se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente se almacenó a -70 °C hasta la realización de los análisis previstos.

Caracterización químico-física de la preparación

Se estudiaron 5 lotes de EDL. En todos los casos se determinó el pH, el espectro de absorción ultravioleta, en el rango comprendido entre 200 y 300 nm, el índice de correlación de los valores de densidad óptica de 260 nm respecto a 280 nm (DO260/280) y la concentración de péptidos presentes según el método de Lowry. Estos ensayos se realizaron antes y después del calentamiento en solución del FT. Se determinó si existían diferencias significativas antes y después del procedimiento según la prueba "t" para series apareadas (16) para un nivel de confianza del 95 %.

Determinación de la actividad biológica

La determinación de actividad biológica del FT, antes y después de pasteurizado, se llevó a cabo estudiando la presencia de factor inhibitorio de la migración leucocitaria (LIF). El ensayo de inhibición de la migración leucocitaria en agarosa (17) se realizó tomando 25 mL de sangre humana total fresca heparinizada, a la cual se añadió igual cantidad de dextrana 70 000 (Pharmacia) al 6 %, y se dejó reposar durante 45 min.

El sobrenadante se separó cuidadosamente y se lavó con igual cantidad de PBS y luego con RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal de

ternera (Integra Biosciences) mediante centrifugaciones sucesivas a 400 x g durante 10 min.

La concentración leucocitaria se ajustó a 2×10^7 células/mL con la misma solución de medio empleada en los lavados; 1 mL de la suspensión celular se centrifugó a 400 x g durante 10 min y el precipitado resultante se resuspendió en una mezcla a partes iguales de medio RPMI-1640 2x (se prepara disolviendo 10,44 g en 500 mL de agua bidestilada) y agarosa (Sigma) al 6 %; 2 µL de la mezcla así obtenida se depositaron en cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Nunc), y se añadió en los pocillos correspondientes los controles de antígeno (Candidina 1:10) y las muestras a una dilución final de 1:4.

La placa se incubó de 18 a 24 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad relativa del 95 %. Después se procedió a la medición de la migración leucocitaria con la ayuda de un lector de microfílm.

El índice de inhibición de la migración leucocitaria (IIML) se calculó dividiendo el valor de la migración de las células en presencia de la muestra más el antígeno entre el valor en presencia del antígeno. Los valores de migración así obtenidos resultaron de la media de 4 réplicas para cada muestra. La inhibición se consideró positiva si el IIML así calculado resultó inferior o igual a 0,8 al menos en 2 de 6 determinaciones con leucocitos de individuos diferentes (18).

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran algunos parámetros químico-físicos (pH, péptidos y relación DO260/280 nm) de los lotes no tratados y tratados. En ningún caso se encontró diferencias significativas antes y después del tratamiento, lo que concuerda con resultados ya reportados (19) y confirma el criterio de la estabilidad química del dializado con posterioridad al tratamiento térmico.

En la Figura 1 se muestra el espectro de absorción UV del FT antes y después de la pasteurización, de manera que cada punto está constituido por el pro-

7. Rivero J, Limonta M, González A, Ramírez V, Aguilera A, López-Saura P. Tratamiento con factor de transferencia en portadores del virus de la inmunodeficiencia humana. *Biología Aplicada* 1993;10(1):2-3.

8. Rivero J, Miró A, del Rosario M, López-Saura P. Efecto del interferón alfa (leucocitario o recombinante) o factor de transferencia en portadores del virus de la inmunodeficiencia humana. *Biología Aplicada* 1995;12(3):161-162.

9. Dubet M, Ruibal O, Vilarrubia OL, Menéndez de San Pedro JC, Navea L, Ojeda M et al. *In vitro* anti-VIH activity of transfer factor. *Biología Aplicada* 1995;12(3):197-198.

10. Fernández-Ortega C, López-Saura P. Obtención y caracterización del factor de transferencia extraído de leucocitos que produjeron interferón. *Memorias del II Seminario Cubano sobre Biología Aplicada* 1986:549-559.

11. WHO/LBS. Global blood, safety initiative. Viral inactivation of blood and blood products. Prepared on behalf of the WHO by Dr. H. Saumela, Finnish Red Cross Blood Transfusion Service, Helsinki, Finland, 1992.

12. Horowitz B. Inactivation of viruses found with plasma protein. *Biotechnology* 1991;19:417-430.

13. Marcus-Sekura CJ. Validation of removal of human retroviruses. Development of Biological Standardization 1992;76:215-223.

14. Eriksson B, Westman L, Jernberg M. Validation of plasma-derived products produced by Pharmacia, with particular reference to immunoglobulins. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1994; 5(3):37-44.

15. Cantell K, Hirvonen S, Kauppinen HL, Myllylä G. Production of interferons in human leukocytes from normal donor with the use of Sendai virus. *Methods of Enzymology*. Ed. Sidney P. Academic Press 1981;78:29-38.

16. Thielmann K. Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. Ed. Organismos. RDA 1973:60-62.

Tabla 1. Comportamiento de algunos parámetros químico-físicos de los lotes de FT antes y después de pasteurizados.

Lote	Indicadores analizados					
	pH		Péptidos (mg/mL)		DO260/280	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
1	6,89 ± 0,01	6,91 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,78 ± 0,02	1,81 ± 0,04	1,75 ± 0,03
2	7,00 ± 0,12	7,01 ± 0,08	0,80 ± 0,02	0,72 ± 0,02	1,74 ± 0,02	1,71 ± 0,06
3	7,01 ± 0,05	7,02 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,76 ± 0,01	1,88 ± 0,09	1,86 ± 0,04
4	7,03 ± 0,09	7,03 ± 0,11	0,76 ± 0,09	0,66 ± 0,09	1,74 ± 0,07	1,73 ± 0,08
5	7,04 ± 0,06	7,02 ± 0,02	0,69 ± 0,17	0,66 ± 0,08	1,75 ± 0,03	1,75 ± 0,10

Cada resultado es el valor medio ± la desviación estándar de 3 experimentos por separado.

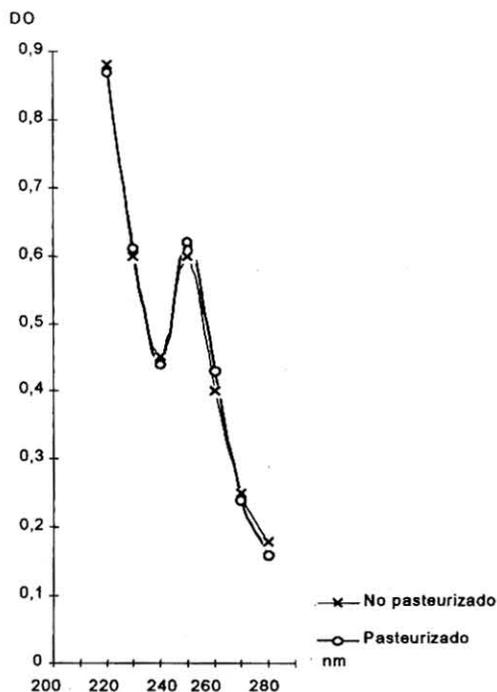


Figura 1. Espectro de absorción UV del FT antes y después de la pasteurización.

medio de las lecturas correspondientes a los 5 lotes estudiados. El análisis corrobora que el tratamiento por calor no influye sobre el espectro característico del producto en el rango estudiado (200-300 nm), ya que no muestra patrones de descomposición como ocurre en otros trabajos publicados (20) al calentar el FT a 100 °C.

Uno de los inconvenientes de la pasteurización de derivados y componentes de la sangre es la posibilidad de la pérdida de la actividad biológica del compuesto tratado (21). En este caso, el criterio de actividad biológica escogido fue la producción de LIF por polimorfonucleares en presencia de candidina. Este ensayo posee correlación *in vitro* con la transferencia de inmunidad de tipo retardado *in vivo* (22), y es el que se emplea habitualmente para demostrar la presencia de actividad de FT en los EDL.

Como se observa en la Tabla 2, la positividad del LIF (expresada como el IIML inferior o igual a 0,8 al menos en 2 de 6 pruebas con leucocitos de individuos diferentes) estuvo presente en 3 de los 6 experimentos realizados a los lotes estudiados. Así, los resultados indican que la pasteurización no afecta la estimulación de esta linfoquina, que conjuntamente con otras participa en los mecanismos de inmunidad celular.

Un aspecto de interés es que en los experimentos realizados no se utilizó ninguna sustancia estabilizante de proteínas durante el calentamiento, lo cual se conoce que contribuye también a incrementar la estabilidad de los virus y constituye uno de los aspectos negativos que se le señalan a la pasteurización (12).

Por otra parte, es preciso destacar que aunque los experimentos se realizaron a pequeña escala (aproximadamente 0,7 %), los indicadores químico-físicos y biológicos están dentro de los rangos de aceptación del producto obtenido a escala productiva, de manera que en las condiciones en que se realizó el trabajo es posible afirmar que el calentamiento en solución durante 10 h a 60 °C, no afecta las propiedades químico-físicas y biológicas del FT, por lo cual este producto es resistente a la metodología descrita y los resultados pueden ser reproducibles a escala de producción.

17. McCoy JL, Dean JH, Herberman RD. Direct and indirect agarose microdroplet migration inhibition assays for detection of cell mediated immunity to human tumor associated antigens. *In vitro Methods in Cell Mediated Immunity*. Eds. Barry, L. R. Academic Press. New York 1975:1-15.

18. Fernández-Órtega C. Normalización de una microtécnica para evaluar el factor inhibitorio de la migración leucocitaria *in vitro*. *Revista Cubana de Inmunología Hematología* 1989;5:290-295.

19. Franke W, Hans-Uwe S. Improvements in the preparation of human large pool DLE with special reference to viral safety. Recent advances in transfer factor and dialyzable leukocyte extracts. *Proceedings of VII International Workshop on transfer factor*. Eds. Takehimo F. Maruzen Co. Ltd. Tokyo 1990:95-100.

20. Zhu B. Isolation of immunomodulator activities from DLE. *Chin J Immunol* 1987;3:214-217.

21. Dideo AJ, Allegrezza AE. Validable virus removal from protein solutions. *Nature* 1991;351:420-421.

22. Lawrence HS. The preparation and purification of transfer factor. *In vitro methods in cell-mediated immunity*. Eds. Bloom, B. R.; P. R. Glade. Academic Press. New York 1971:76-85.

Tabla 2. Estimulación de la producción de LIF^a por el FT no pasteurizado (NP) y pasteurizado (P), respectivamente.

Experimentos	Índice de inhibición de la migración leucocitaria ^b											
	1		2		3		4		5		6	
Lote	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
1	0,63	0,76	1,02	1,08	0,56	0,60	0,84	0,87	0,52	0,54	1,00	1,13
2	0,73	0,80	0,90	0,87	0,63	0,75	0,88	0,86	0,78	0,69	1,11	0,98
3	0,56	0,53	0,97	0,93	0,55	0,71	1,03	1,01	0,61	0,46	1,03	1,08
4	0,52	0,61	0,83	0,89	0,52	0,78	0,86	0,97	0,60	0,66	1,16	1,13
5	0,71	0,75	1,08	1,10	0,57	0,72	0,98	1,12	0,66	0,61	0,98	1,03

^aSe utilizó candidina (1:10) como antígeno sensibilizante.

^bMedia del índice de inhibición de la migración leucocitaria en experimentos por triplicado. La desviación estándar en ningún caso superó el 10 % de la media.