



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS DE UN EXTRACTO DIALIZABLE LEUCOCITARIO (TRANSFERON®)
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE PROTEÍNAS”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

OMAR GONZÁLEZ FASCINETTO



CD.MX.

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesora: Sonia Mayra Pérez Tapia**

SECRETARIO: **Profesora: Xochiquetzal González Rodríguez**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE BIOPROCESOS (UDIBI)

ASESOR DEL TEMA: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

SUSTENTANTE: OMAR GONZÁLEZ FASCINETTO

CONTENIDO:

ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1 Antecedentes generales de los EDL	
1.2 Cromatografía líquida de proteínas	
1.3 Antecedentes acerca de la caracterización cromatografica de los EDL	
1.4 Transferón®	
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos particulares	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Estandarización del método cromatográfico para fraccionamiento	
5.2 Lote piloto de Transferón® (14D12-A)	
5.3 Principios cromatográficos empleados para el análisis de Transferón®	

- 5.4 Condiciones de corrida
- 5.5 Selección del método cromatográfico y fraccionamiento
- 5.6 Tratamiento de los lotes de Transferón® a fraccionar
- 5.7 Preparación de reactivos para FPLC y limpieza del equipo
- 5.8 Fraccionamiento y colecta de fracciones
- 5.9 Tratamiento y caracterización fisicoquímica de las fracciones colectadas:
 - 5.9.1 Remoción de endotoxina bacteriana
 - 5.9.2 Esterilización
 - 5.9.3 Identidad
 - a) UPLC
 - b) FPLC
 - 5.9.4 Determinación del contenido peptídico
 - a) Por medición de absorbancia a 280 nm
 - b) Por el método del ácido bicinconínico
 - 5.9.5 Ensayo biológico para la estimulación de la producción de INF- γ y en cultivo de células Jurkat
 - 5.9.6 Determinación de la cantidad de IFN- γ producida en los sobrenadantes recuperados por ELISA

6. RESULTADOS.....33

- 6.1 Estandarización del método cromatográfico para el fraccionamiento de Transferón®
 - 6.1.1 Exclusión molecular (Columna *Superdex Peptide 10/300 GL*®)
 - 6.1.2 Exclusión molecular (Columna *Ultrahydrogel 500*®)
 - 6.1.3 Interacción hidrofóbica (Columna *XK 17/20, Resina Butil Sepharose Fast Flow*®)
 - 6.1.4 Intercambio aniónico (Columna *XK 17/20, Resina DEAE Sepharose Fast Flow*®)
 - 6.1.5 Intercambio catiónico (Columna *XK 17/20, Resina CM Sepharose Fast Flow*®)

- 6.2 Fraccionamiento de Transferón®
- 6.3 Análisis de identidad y pureza de las fracciones obtenidas
 - 6.3.1 Determinación de identidad y pureza por FPLC
 - 6.3.2 Determinación de identidad y pureza por SE-UPLC
 - 6.3.3 Determinación del contenido peptídico
 - 6.3.4 Prueba confirmatoria de esterilidad
 - 6.3.5 Determinación del contenido de endotoxina bacteriana
 - 6.3.6 Ensayo biológico para la estimulación de la producción de INF- γ en cultivo de células Jurkat

7. DISCUSIÓN.....	65
8. CONCLUSIONES.....	68
9. BIBLIOGRAFÍA.....	69

ABREVIATURAS

1. **EDL:** Extracto dializable leucocitario
2. **FPLC:** Del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*
3. **IPN:** Instituto Politécnico Nacional
4. **IFN- γ :** Interferón gamma
5. **DTH:** Del inglés *Delayed Type Hypersensitivity*
6. **kDa:** Kilodalton
7. **GMPc:** Guanosin mono-fosfato cíclico
8. **MIF:** Del inglés *Macrophage inhibitory factor*
9. **LIF:** Del inglés *Leukemia Inhibitory factor*
10. **SEC:** Del inglés *Size Exclusion Chromatography*
11. **KLH:** Del inglés *Keyhole Limpet Hemocyanin*
12. **PPD:** Del inglés *Purified protein recombinant*
13. **OVA:** Ovoalbúmina
14. **ELISA:** Del inglés *Enzyme Linked Inmunosorbent Assay*
15. **pI:** Punto isoelectrico
16. **UPLC:** Del inglés *Ultra Perfomance Liquid Chromatography*
17. **SE-UPLC:** Del inglés *Size Exclusion Ultra Perfomance Liquid Chromatography*
18. **ConA:** Concanavalina A
19. **SFB:** Suero fetal bovino
20. **mM:** Milimolar
21. **μ g:** Microgramo
22. **μ L:** Microlitro
23. **mg:** Miligramo
24. **UE/mL:** Unidades de endotoxina por mililitro

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características fisicoquímicas e inmunológicas descritas en los primeros trabajos de caracterización de los EDL.

Tabla 2: Principios cromatográficos y condiciones empleadas para la caracterización y estandarización del método de fraccionamiento de Transferón® por FPLC.

Tabla 3: Reactivos empleados para realizar el fraccionamiento de Transferón® mediante FPLC.

Tabla 4: Intervalos de colecta promedio entre los 3 lotes de Transferón®

Tabla 5: Parámetros cromatográficos promedio obtenidos de las 15 corridas de fraccionamiento para cada uno de los 3 lotes de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16) mediante FPLC.

Tabla 6: Parámetros cromatográficos promedio de los 3 lotes fraccionados de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16).

Tabla 7: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones por SE-FPLC.

Tabla 8: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del estándar comercial de peso molecular (*Biorad Gel Filtration Standard*®) mediante SE-UPLC.

Tabla 9: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del estándar interno de Transferón® mediante SE-UPLC.

Tabla 10: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del blanco (agua inyectable) mediante SE-UPLC.

Tabla 11: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 14D12-A mediante SE-UPLC.

Tabla 12: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 13C09 mediante SE-UPLC.

Tabla 13: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 13E16 mediante SE-UPLC.

Tabla 14: Contenido peptídico (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) por el método de BCA para las fracciones obtenidas de Transferón®.

Tabla 15: Contenido peptídico (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) por medición de absorbancia a 280 nm para las fracciones obtenidas de Transferón®.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de los elementos que conforman un sistema FPLC y fotografía de un sistema FPLC para purificación de proteínas disponible en el mercado.

Figura 2: Perfil cromatográfico obtenido del EDL de pacientes sensibles a PPD, candidina y estreptocina (Burger *et. al.*).

Figura 3: Perfiles cromatográficos de EDL's analizados y fraccionados mediante exclusión molecular (columna *Sephadex G25*) (Zuckerman *et al.* Neidhart *et. al.*)

Figura 4: Perfil cromatográfico de Transferón® obtenido por cromatografía de exclusión molecular (SEC-UPLC) (Medina Rivero *et al.*).

Figura 5: Esquema de los componentes que conforman el módulo principal del equipo cromatográfico para separación y purificación de proteínas (*GE-Amersham Biosciences AKTA FPLC®*).

Figura 6: Metodología para la determinación del contenido de endotoxina bacteriana mediante el método de "Gel clot®"

Figura 7: Metodología para la determinación del contenido peptídico por el método de BCA, empleando el kit "Pierce®".

Figura 8: Metodología empleada para realizar el ensayo biológico de estimulación en cultivo de células Jurkat.

Figura 9: Metodología para realizar la determinación del contenido de IFN-gamma en los sobrenadantes obtenidos del ensayo biológico de estimulación.

Figura 10: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por exclusión molecular con la columna *Superdex Peptide 10/300 GL*.

Figura 11: Perfiles cromatográficos del estándar comercial de peso molecular (*Biorad® Gel Filtration Standard*). Obtenido con una columna *Superdex Peptide 10/300 GL* y el reportado por el fabricante.

Figura 12: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por exclusión molecular con la columna *Ultrahydrogel 500*.

Figura 13: Perfiles cromatográficos del estándar comercial de peso molecular (*Biorad® Gel Filtration Standard*). Obtenido con una columna *Ultrahydrogel 500* y el reportado por el fabricante.

Figura 14: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por interacción hidrofóbica con una columna *XK 16/29* y la resina *Butil Sepharose 4 Fast Flow*.

Figura 15: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por intercambio aniónico con una resina *DEAE Sepharose Fast Flow*.

Figura 16: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por intercambio catiónico con una resina *CM Sepharose Fast Flow*.

Figura 17: Cromatogramas obtenidos del fraccionamiento del 3 lotes de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16) por el principio de exclusión molecular con una columna *Ultrahydrogel 500*.

Figura 18: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 14D12-A mediante SE-FPLC.

Figura 19: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13C09 mediante SE-FPLC.

Figura 20: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13E16 mediante SE-FPLC.

Figura 21: Perfiles cromatográficos del estándar interno de Transferón®, del estándar comercial de peso molecular y del disolvente (agua), obtenidos mediante SE-UPLC.

Figura 22: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 14D12-A mediante SE-UPLC.

Figura 23: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13C09 mediante SE-UPLC.

Figura 24: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13E16 mediante SE-UPLC.

Figura 25: Concentración de péptidos totales (expresada en $\mu\text{g/mL}$) obtenida de las fracciones de 3 lotes de Transferón® por el método de BCA.

Figura 26: Concentración de péptidos totales (expresada en $\mu\text{g/mL}$) obtenida de las fracciones de 3 lotes de Transferón® por medición de absorbancia a 280 nm.

Figura 27: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con las fracciones del lote 14D12-A.

Figura 28: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con las fracciones del lote 13C09.

Figura 29: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con los controles de ensayo (Concanavalina A, fase móvil y medio de cultivo)

RESUMEN:

Los EDL son mezclas peptídicas de bajo peso molecular que se obtienen de la disrupción de paquetes leucocitarios y que se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades con componente inflamatorio. Transferón® es un EDL fabricado por el IPN y comercializado como bioterapéutico debido a que cumple con los atributos de calidad necesarios, sin embargo, y debido a la complejidad que presenta este bioterapéutico, se desarrollan proyectos de investigación que buscan la caracterización fisicoquímica y biológica de Transferón® para relacionar la composición con su función. Es por ello que en el presente trabajo se busca realizar el fraccionamiento mediante FPLC de diferentes lotes de Transferón®, así como caracterizar fisicoquímicamente las fracciones obtenidas y por último evaluar la actividad biológica de estas mediante un modelo *in vitro* con el fin de identificar a la o las fracciones con actividad biológica.

La estandarización de la metodología de fraccionamiento incluyó probar diferentes condiciones de corrida cromatográfica a fin obtener un mejor rendimiento, empleando diferentes principios de separación (intercambio, iónico, exclusión molecular e interacción hidrofóbica). La columna de exclusión molecular *Ultrasphere 500* se seleccionó como la más adecuada, debido a que fue la más resolutive para el fraccionamiento de Transferón®, la cual permitió obtener un perfil conformado por 6 picos, los cuales se fraccionaron.

La actividad biológica de las fracciones se evaluó por la producción de IFN- γ en un cultivo de células Jurkat, en 2 de 3 lotes característicos de Transferón®.

Los resultados de la caracterización muestran un comportamiento consistente en las fracciones obtenidas, confirmado por la reproducibilidad del contenido de proteína total y de los perfiles cromatográficos obtenidos por exclusión molecular preparativa y analítica. Con respecto a la evaluación biológica, solamente se detectó producción de IFN- γ en la fracción 4 en los dos lotes evaluados, mientras que las

fracciones 2, 5 y 6 no muestran una producción consistente entre los 2 lotes evaluados.

A partir de lo anterior se logró correlacionar la actividad biológica con una de las fracciones que contiene la mezcla peptídica de Transferón®. Esto suma al conocimiento funcional del producto de manera complementaria y permite plantear la evaluación de estas mismas fracciones en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* dada su naturaleza como inmunomodulador.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Antecedentes generales de los EDL:

Los extractos dializados leucocitarios (EDL) son mezclas heterogéneas compuestas principalmente por péptidos de bajo peso molecular. Estos se obtienen de la ruptura de leucocitos de sangre periférica de donadores sanos y su posterior diálisis a partir de una membrana cuyo tamaño de poro es de 10 kDa. Son capaces de actuar modulando la respuesta inmunológica, mejorando el curso clínico de enfermedades infecciosas, alergias, cáncer e inmunodeficiencias (1).

Los primeros antecedentes acerca de la inducción de una respuesta celular en individuos hacia antígenos específicos surgen en el año de 1942 cuando Landsteiner y Chase realizaron los primeros ensayos en cobayos, donde se evidenciaba la adquisición de una respuesta inmunológica conocida como DTH (Hipersensibilidad cutánea retardada) en individuos en un principio anérgicos ante la inyección intradérmica del bacilo de Calmette Guérin (BCG), esto tras la administración de leucocitos viables obtenidos de sujetos que presentaban una fuerte respuesta de DTH ante el bacilo. Sin embargo este fenómeno se pudo evidenciar solo cuando se empleaban leucocitos en su forma íntegra y viable, de modo que la administración de leucocitos no viables así como el extracto celular obtenido de la lisis de estos no producía ningún efecto (2).

Tiempo más tarde, en el año de 1949, el inmunólogo estadounidense Henry Sherwood Lawrence fue el primer investigador en realizar estudios en humanos, demostrando que tanto los leucocitos viables como el extracto dializado obtenido de la lisis de estos lograban inducir una respuesta DTH en individuos inicialmente no sensibles a tuberculina y dicha respuesta prevalecía aun tras varios meses de ser tratados con EDL (2). Ante estas observaciones Lawrence propuso que la respuesta inmunológica podía ser "transferida" de un individuo sensible a cierto antígeno a otro individuo no sensible gracias a un compuesto presente tanto en leucocitos como en el extracto dializado de estos, cuya naturaleza y características eran desconocidas y al cual denominó como "Factor de Transferencia".

Hoy en día se sabe que la respuesta inmunológica no se “transfiere” entre individuos mediante la administración de células o de los extractos obtenidos de estas, si no que existen moléculas que son capaces de inducir y activar los mecanismos de la respuesta inmunológica de cada individuo. Sin embargo el término “Factor de Transferencia” sigue utilizándose de manera análoga en muchos lugares para referirse a los EDL.

Lo propuesto por Lawrence generó gran interés por parte de diversos investigadores de la época que se centraron en caracterizar al “Factor de Transferencia” y a los EDL, tanto en humanos como en otras especies, a fin de explicar el mecanismo de acción así como los elementos responsables de sus efectos y las implicaciones inmunológicas de los EDL.

Dentro de las características más importantes en los EDL se obtuvieron como resultado de los primeros trabajos de investigación, se encuentran las siguientes:

Tabla 1: Características fisicoquímicas e inmunológicas descritas en los primeros trabajos de caracterización de los EDL.

Características fisicoquímicas	Características biológicas e inmunológicas
<ol style="list-style-type: none"> 1. Conformado por moléculas de bajo peso (menores a 10 kDa.) (3, 6) 2. En un estudio de caracterización se reportó la presencia de moléculas como: histamina, serotonina, timosina, prostaglandinas, ascorbato, nicotinamida, hipoxantinas y uracilo (10). 3. Se ha identificado que las moléculas responsables de la inducción de DTH poseen un tamaño entre 3.5 y 5.0 kDa. (8, 9). 4. Termolábil: La exposición a temperaturas de 56°C o superiores ocasiona pérdida total de la actividad biológica (3, 6) 5. Resiste procesos de congelamiento y descongelamiento, temperaturas de hasta -70°C y el proceso de diálisis, también es resistente al tratamiento con RNAasa y 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Por lo general la inducción de DTH en individuos receptores del EDL solo es específica para los antígenos a los cuales es sensible el individuo donador (existen excepciones). 2. El EDL ejerce su acción a través de la activación tanto de vías específicas como de vías inespecíficas de la respuesta inmunológica (9). 3. Algunas de las acciones por vías inespecíficas del EDL son: Actividad quimiotáctica sobre células polimorfonucleares, cambios en las cascadas de señalización celulares (acumulación de GMPc), activación de macrófagos y mejora de la respuesta linfocitaria a agentes mitogénicos. 4. Acciones por vías específicas: Inducción de citotoxicidad mediada por células, favorecimiento de

Tabla 1 (Continuación): Características fisicoquímicas e inmunológicas descritas en los primeros trabajos de caracterización de los EDL

<p>DNAsa pancreáticas, hidrolasas lisosomales y tripsina (3, 6, 7)</p> <p>6. El EDL liofilizado es estable hasta por 5 años almacenado a -5°C (3)</p>	<p>5. la síntesis de anticuerpos, inducción de la síntesis de citocinas como: MIF, LIF e IFN-γ (2, 9).</p> <p>6. La sensibilización tras administrar EDL a un individuo se da de manera sistémica (3)</p> <p>7. La duración de la sensibilización es variable según el antígeno del que se trate, pero puede perdurar por varios meses o incluso hasta por años. (3)</p> <p>8. Generalmente no se induce respuesta frente a antígenos a los cuales el individuo donador del EDL no responde. Sin embargo existen excepciones.(3)</p> <p>9. No hay presencia de inmunoglobulinas en el EDL obtenido de diversas fuentes (3, 6, 7, 8)</p> <p>10. El EDL no presenta actividad como antígeno o inmunógeno ni tampoco tiene similitud con moléculas que conformen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o receptores de linfocitos T (7, 8)</p>
---	--

Los EDL, han tenido desde su descubrimiento diversas aplicaciones terapéuticas como inmunomodulador, principalmente en el tratamiento de infecciones asociadas a micobacterias, hongos, virus y parásitos, así como algunas enfermedades en donde la respuesta inmunológica de los individuos se ve comprometida. Por otra parte, también existe evidencia de su aplicación en cáncer y enfermedades de origen neuronal. A continuación se hace un muy breve apartado de las aplicaciones más destacadas de los EDL.

Enfermedades causadas por hongos:

Los EDL han mostrado eficacia en el tratamiento de infecciones causadas por hongos, los ejemplos más destacados son infecciones por *Candida albicans* y *Coccidioides immitis* (agente causal de la coccidioidomicosis), donde se ha observado que tanto la condición inmunológica de los pacientes como la fuente de

origen del EDL son factores que influyeron en la progresión del tratamiento, es decir, los pacientes que reciben EDL obtenido de individuos que presentan DTH considerable a los antígenos de *C. albicans* y *C. immitis* presentan mejoras más significativas con respecto a pacientes que reciben EDL derivado de sujetos con DTH baja o nula (11). En el caso de la coccidioidomicosis, se tiene reportado que la terapia basada en el uso de EDL muestra mejorías significativas cuando se conjunta con antifúngicos convencionales, mostrando que los EDL induce cambios en la respuesta a nivel celular (inducción de DTH, aumento de MIF y transformación linfocitaria) en pacientes inmunodeficientes (12).

Enfermedades causadas por micobacterias:

Los EDL han mostrado buenos resultados en diversos estudios en los que se analiza el tratamiento de individuos que padecen tuberculosis y lepra, encontrando mejoras clínicas considerables al favorecer la desaparición de las lesiones granulomatosas y la eliminación del microorganismo, algo que, según los autores de dichos estudios, no se observa solamente con el tratamiento utilizado convencionalmente (13). Se ha demostrado que los EDL permiten hacer frente a la infección mediante el restablecimiento de la cantidad y la funcionalidad de linfocitos T en estos pacientes, previamente deficientes en respuesta celular (14).

Enfermedades causadas por virus:

Los EDL aplicados al tratamiento de enfermedades virales han presentado resultados positivos en infecciones asociadas a Herpes Simplex y Herpes Zooster (15, 16), Hepatitis Crónica (18) y Varicela Zooster (17), donde se ha observado una disminución considerable de la mortalidad en pacientes infectados, además de mejoras clínicas en las que se incluye restablecimiento de las funciones celulares linfocitarias con respecto a otros métodos terapéuticos empleados. Sin embargo se ha observado gran variabilidad en los resultados entre diferentes grupos de investigación y entre pacientes.

Los EDL también se han estudiado en otras infecciones virales como la neumonía asociada al sarampión, la esclerosis subaguda, la aparición de verrugas, el

síndrome de Behcet y la alopecia, ya sea como auxiliar o como agente terapéutico único (4, 9).

Enfermedades relacionadas con la respuesta inmunológica:

a) Inmunodeficiencias combinadas severas e hipoplasia tímica:

Los estudios realizados acerca de la eficacia de los EDL en el tratamiento de inmunodeficiencias combinadas severas e hipoplasia tímica han mostrado resultados pobres, pues los pacientes tratados con EDL no presentan en general signos de restablecimiento en las funciones inmunológicas celulares e incluso prevalece el estado de anergia a la reacción DTH con diversos antígenos. Solamente se han observado mejorías tras un trasplante de timo, en donde se establece una respuesta favorable de los pacientes con la terapia a base de EDL (20), lo que indirectamente sugiere el blanco de acción de los EDL sobre la función celular linfocitaria.

b) Síndrome de Wiscott –Aldrich, ataxia telangiectasia, hiper e hipo-inmunoglobulinemias:

El tratamiento con EDL en pacientes que padecen Síndrome de Wiscott –Aldrich muestra mejoras en cuanto a la disminución de la susceptibilidad frente a infecciones, mejoramiento del eczema cutáneo, disminución de sangrados recurrentes y disminución de tamaño del bazo, así como mejoras en la calidad y funcionalidad de receptores Fc para IgG (21). Sin embargo, también se evidenció que la eficacia de los EDL era dependiente de la respuesta celular de cada paciente en particular. En el caso de la ataxia telangiectasia no se han obtenido efectos considerables de los pacientes tratados con EDL, pues la mejoría es temporal y no se logra el restablecimiento total de las funciones inmunológicas celulares, por lo que existen recaídas después de un tiempo (22). Por último, con respecto a las hipo e hiperinmunoglobulinemias, los resultados en pacientes son muy variables, las mejorías reportadas en pacientes administrados con EDL incluyen elevación de

los niveles de IgG en pacientes deficientes y disminución de los niveles de IgM en pacientes con síndrome del hiper-IgM (23).

Cáncer:

Los EDL han sido utilizados en casos de melanoma, osteosarcoma, cáncer de pecho, cáncer nasofaríngeo y cáncer de pulmón (24, 25), donde entre los efectos más destacables se encuentran la prolongación de la vida media debido a la disminución de la metástasis a pulmón en pacientes con osteosarcoma, formación de anticuerpos protectores contra el virus de Epstein Barr, además de demostrar un efecto restaurador en las funciones linfocitarias celulares en pacientes con cáncer de pulmón y que se encontraban en un estado de inmunosupresión (26). En general se concluye que la eficacia del EDL como agente terapéutico en cáncer depende de la inmunocompetencia de cada individuo, siendo los individuos con una mayor intensidad en respuesta celular los que presentan mejorías más considerables.

Otros usos terapéuticos:

Existen otras enfermedades en las cuales el EDL ha demostrado beneficios a los pacientes tratados, ya sea como terapia alterna o bien, como adyuvante. Algunas de estas enfermedades incluyen: el asma, la dermatitis y las alergias, donde se tiene reportado que el EDL favorece la normalización de la respuesta tanto celular como humoral (27, 28); la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple (10), así como algunas enfermedades de origen neuronal como la epilepsia (29), el síndrome de Alzheimer (30), el autismo (31) y la depresión (32).

1.2 Cromatografía líquida de proteínas :

Generalidades:

La cromatografía líquida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) es el término designado a una técnica que permite la separación de una o varias proteínas a partir de una mezcla de estas. La separación se lleva a cabo en función del reparto que existe entre las proteínas que conforman la mezcla y las fases del sistema (fase móvil y fase estacionaria). La fase estacionaria consiste en un medio sólido que retiene a las proteínas con base en sus propiedades fisicoquímicas, como son: carga, tamaño, polaridad y afinidad a un ligando específico. Por otro lado, la fase móvil consiste en un medio líquido que conduce a las proteínas a través del sistema cromatográfico y que proporciona las condiciones adecuadas para favorecer la interacción proteína-fase estacionaria. Cada proteína en particular interacciona de manera diferente con la fase estacionaria, teniendo un tiempo específico para lograr su paso a través de la columna y de esta manera separarse de la mezcla (33).

Componentes y funcionamiento de un sistema FPLC:

Para realizar una separación proteica por cromatografía, actualmente existen equipos especializados que realizan el proceso de manera automatizada, aumentando la eficiencia de la separación y permitiendo un control preciso de las condiciones. Estos equipos denominados FPLC, cuentan con líneas de alimentación independientes que permiten el ingreso de la o las soluciones que conforman la fase móvil, la cual es conducida gracias a la presión generada por una bomba a través de una serie de conductos. El sistema cuenta con un mezclador que permite combinar diferentes proporciones de las soluciones con el fin de formar gradientes, lo cual es útil en separaciones por ciertos principios cromatográficos. La muestra a purificar (mezcla proteica) ingresa al sistema mediante una válvula de inyección y es conducida por la fase móvil hasta llegar a la columna, donde se lleva a cabo la separación y que se encuentra conformada en su interior por una matriz o cama de numerosas perlas a la cual se le denomina resina. Las perlas que conforman la resina tiene propiedades que permitirán la retención de las proteínas

en diferente grado basándose en sus características fisicoquímicas, dependiendo del principio cromatográfico empleado. A la salida de la columna existen diferentes sensores acoplados con el fin de determinar los cambios producidos en tiempo real de las condiciones basales en los parámetros tras la salida de diferentes componentes de la mezcla peptídica como pH, conductividad, absorbancia UV, presión, temperatura y flujo. El monitoreo de los parámetros de corrida así como el control preciso del sistema se realiza mediante un software especializado. Adicionalmente, el sistema cuenta con un accesorio que permite coleccionar los componentes que eluyen de la columna de separación, proceso al que se le denomina fraccionamiento. De no realizarse la colecta, el contenido que eluye de la columna será conducido al recipiente de residuos del equipo (34, 35, 36). En la figura 1 se esquematizan los diferentes componentes de un sistema FPLC típico.

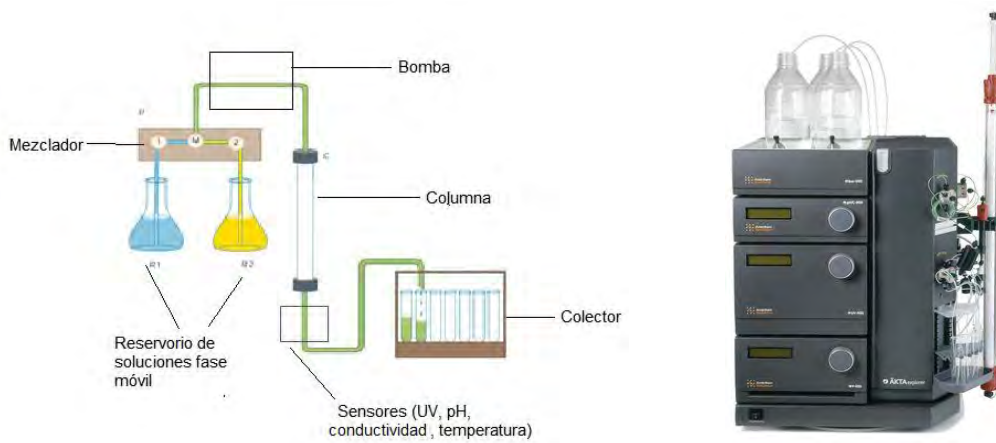


Figura 1: Esquema representativo de los elementos que conforma un sistema FPLC (izquierda) y fotografía de un sistema FPLC para purificación de proteínas disponible en el mercado (derecha)

Principios cromatográficos de separación:

Como ya se mencionó, existen diferentes principios de separación con base en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas para realizar la separación:

a) Cromatografía de exclusión molecular (SEC):

También conocida como cromatografía de permeación en gel o de exclusión en gel. En esta variante cromatográfica la separación de las moléculas se realiza a partir de su peso molecular, tamaño y disposición espacial (38). La fase estacionaria consiste en una matriz conformada por múltiples perlas de polímeros que presentan un tamaño de poro definido, por lo tanto las proteínas que resulten más grandes con respecto al tamaño del poro de las perlas no se retienen y por consiguiente saldrán de la columna a la misma velocidad del flujo de fase móvil. Por otro lado, las moléculas que presentan un tamaño menor y puedan penetrar en los diferentes poros de la matriz saldrán del sistema posteriormente. Es importante mencionar que existen interacciones secundarias de tipo electrostático entre las proteínas y la resina que podrían interferir en el rendimiento de la separación, por ello se emplean buffers salinos como fase móvil de tal forma que se minimicen interacciones secundarias y a la vez se favorezca la estabilidad de las proteínas (39).

b) Cromatografía de interacción hidrofóbica:

En la cromatografía de interacción hidrofóbica, la separación de las proteínas se realiza con base a la interacción que existe entre los residuos no polares de los aminoácidos de los cuales se conforman y los grupos hidrocarbonados anclados a las perlas presentes en la fase estacionaria (grupos butil, octil, éter y fenil). Para lograr la exposición de los grupos no polares inicialmente internalizados en la misma proteína cuando esta se encuentra en ambientes acuosos, se emplea primero como fase móvil una solución con alto contenido salino para de esta forma favorecer la interacción con la resina. Posteriormente, la elución se realiza aplicando en forma de gradiente una solución cuyo contenido salino resulte mucho menor, con lo se favorece de nuevo la internalización de los grupos no polares de los aminoácidos que conforman la proteína y se rompe la interacción con la resina. Es de esperarse que las proteínas con menor cantidad de residuos no polares eluyan primero al establecer interacciones menos fuertes con la resina, contrario a lo que sucede con las proteínas más hidrofóbicas que salen del sistema posteriormente. Factores

como el pH y la temperatura de la fase móvil deben controlarse ya que también pueden tener contribución en la interacción proteína-resina (40, 41).

c) Cromatografía de intercambio iónico (intercambio aniónico y catiónico):

En la cromatografía de intercambio iónico, la separación se realiza en función de la carga neta que presenten las proteínas bajo condiciones de pH o fuerza iónica determinadas. El grado de interacción que exista entre las proteínas y la fase estacionaria dependerá de la carga total de la proteína así como de la densidad y distribución de esta carga en la molécula. Existen dos variantes de la cromatografía de intercambio iónico: cromatografía de intercambio catiónico, en donde se tiene una resina cuyos grupos funcionales presentan carga negativa (grupos carboxilo, sulfóxido, sulfopropil, metilsulfonato y carboximetil), por lo tanto las proteínas que bajo las condiciones de pH y fuerza salina proporcionadas por el medio (fase móvil) presenten carga positiva, interaccionan con la resina y se retienen. Y la cromatografía de intercambio aniónico, en donde la resina presenta grupos funcionales con carga neta positiva (dietilaminoetil o dietilaminopropil) que interaccionan con proteínas de carga neta negativa bajo las condiciones de medio en el que estas se encuentren.

Para romper la interacción proteína-resina en ambas variantes, es necesario el uso de una segunda fase móvil que modifique el pH o la fuerza iónica tal que se asegure el cambio de carga neta en la proteína y por consiguiente la elución (42).

d) Otros principios cromatográficos:

Además de los principios mencionados anteriormente, existen otras variantes, como la cromatografía de afinidad, en donde la separación de proteínas se realiza con base en una interacción reversible entre estas y un ligando específico acoplado a la matriz o resina. Esto resulta de gran utilidad cuando se busca separar proteínas empleando su función biológica o estructura, pues permite la discriminación entre formas nativa o desnaturalizada con un alto grado de rendimiento. La elución se

realiza tanto de manera específica a través del uso de ligandos competitivos o de manera no específica cambiando el pH o la fuerza iónica de la fase móvil (43).

Otro principio cromatográfico empleado es la cromatografía en fase reversa, cuyo fundamento es muy similar al utilizado en la cromatografía de interacción hidrofóbica con la excepción de que se utilizan como fase móvil mezclas de disolventes orgánicos como el acetonitrilo y el metanol, además de que la resina está compuesta por cadenas hidrocarbonadas largas de naturaleza aún más hidrofóbica (41).

1.3 Antecedentes acerca de la caracterización cromatográfica de EDL:

Los primeros estudios de los EDL empleando cromatografía líquida de proteínas los llevo a cabo Lawrence en 1963, mediante una resina de exclusión molecular (*Sephadex G25*®), logrando la separación de sus componentes en 2 fracciones, a las cuales posteriormente realizó pruebas de actividad biológica en modelos *in vivo*, encontrando algún grado de actividad en ambas (44).

Posteriormente, y siguiendo la estrategia propuesta por Lawrence, Burger R. (1976) fraccionó el EDL obtenido de donadores con DTH a PPD, candidina y esptreptocina, empleando la resina *Sephadex G25* y obteniendo 4 fracciones (figura 2). Las fracciones se analizaron en cuanto a función biológica, obteniendo en la fracción 3 (correspondiente al pico mayoritario) una mayor actividad al ser evaluada tanto en la inducción de reacción DTH antígeno específica como en su efecto proliferativo sobre cultivos linfocitarios. Por el contrario, las fracciones 1 y 4 mostraron un efecto inhibitorio de la estimulación linfocitaria al adicionarse junto con agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina A y la concanavalina A. El análisis mediante espectrometría de masas en la fracción 4 sugirió como principal componente a la nicotinamida, molécula que el autor consideró como responsable del efecto antiproliferativo en cultivos linfocitarios (9).

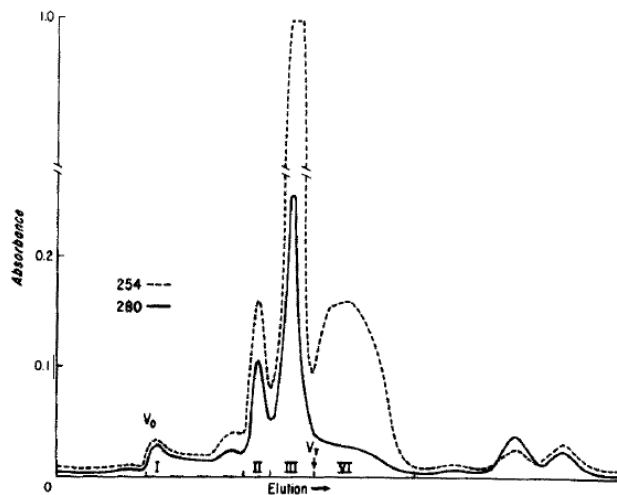


Figura 2: Perfil cromatográfico obtenido del EDL de pacientes sensibles a PPD, candidina y esptreptocina. Trabajo de Burger et. al.

Nota: Columna *Sephadex G-25*, fase móvil: Agua destilada, flujo: 0.5 mL/min.

Por otra parte, Zuckerman *et al.* (1974) fraccionó el EDL obtenido de individuos sensibles a los antígenos KLH y PPD mediante exclusión molecular, obteniendo 5 fracciones y encontrando la capacidad de inducir DTH antígeno específica solo en una de las fracciones (45). De la misma forma, Neidhart y su grupo de investigación, en el año de 1973 realizaron el fraccionamiento de EDL obtenido de individuos sensibles a PPD por exclusión molecular encontrando resultados muy similares (inducción de DTH contra PPD solamente en una de las 4 fracciones obtenidas), un posterior análisis fisicoquímico de la fracción activa reveló un alto contenido de nucleótidos, así como una mayor actividad biológica de dicha fracción en forma aislada con respecto a la actividad biológica obtenida en el EDL sin fraccionar, por lo que la presencia de componentes inhibitorios y regulatorios de la activación celular en el EDL total es una posible explicación a este hallazgo (46). Es importante destacar que ambos trabajos se describe un perfil cromatográfico muy similar así como coincidencias en la fracción activa biológicamente (figura 3).

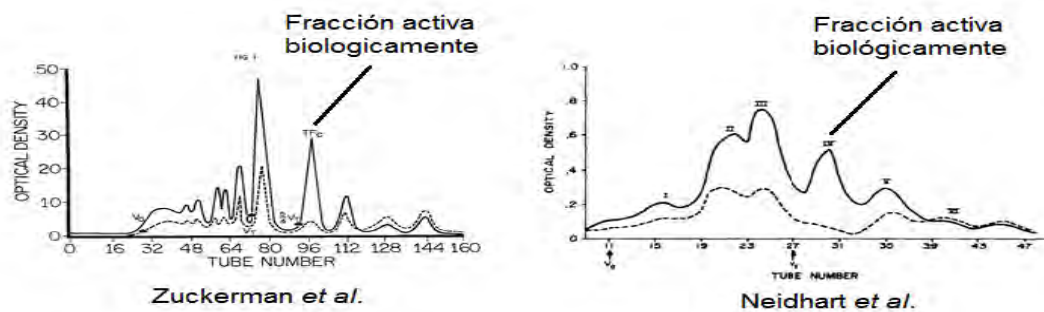


Figura 3: Perfiles cromatográficos de EDL's analizados y fraccionados por exclusión molecular (columna Sephadex G25) por Zuckerman et al. y por Neidhart et al.

Nota: Condiciones de corrida Zuckerman: Buffer de bicarbonato/amonio 0.01 M, flujo 0.6 mL/min. Condiciones de corrida Neidhart: Buffer de fosfatos 0.01 M, flujo 13.8 cc/cm²/hr.

En otros trabajos se han realizado fraccionamientos del EDL utilizando métodos cromatográficos diferentes a exclusión molecular. Baram y Mosko *et al.* (1962) llevaron a cabo el fraccionamiento de un EDL mediante cromatografía de

intercambio aniónico logrando obtener 7 fracciones, de las cuales solamente 2 de estas presentaron efectos biológicos significativos (47). En un estudio subsecuente encontraron la presencia de adenina, guanina y citosina y ribosa en las fracciones biológicamente activas (48).

Khan A. *et al.* (28) en 1980 realizó un fraccionamiento de EDL obtenido de sujetos sanos por cromatografía de intercambio aniónico, obteniendo un total de 21 fracciones, hallando encontrando moléculas como hipoxantina y uracilo en algunas de ellas, mientras que en la fracción biológicamente activa se encontró la presencia de moléculas de naturaleza peptídica de aproximadamente 1870 Da, además de carbohidratos como ribosa y hexosa.

Por último, Kirkpatrick, en el año 2000 fraccionó el EDL obtenido de ratones y de carneros inmunizados previamente con diferentes antígenos (OVA, ferritina y HSV-1) mediante cromatografía de afinidad, basándose en la interacción específica de los EDL con los antígenos utilizados para las inmunizaciones. Las diferentes fracciones obtenidas fueron purificadas por exclusión molecular e interacción hidrofóbica para obtener péptidos que posteriormente fueron secuenciados. Dentro de los resultados, se encontró principalmente una secuencia peptídica común en los EDL obtenidos para diferentes antígenos tanto en ratón como en carnero, sin embargo esta secuencia administrada de manera aislada no es capaz de inducir una respuesta DTH específica, por lo que se deduce que este péptido actúa en conjunto con otros elementos en el EDL para producir un efecto biológico (49).

1.4 Transferón®:

Transferón® es una EDL fabricado y comercializado en México por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN), bajo buenas prácticas de fabricación y con autorización de la Secretaria de Salud. Transferón® es producido con base en una versión modificada del método de Borkowsky y Lawrence, en donde los paquetes leucocitarios de mil donadores sanos son sometidos a cinco ciclos de congelamiento – descongelamiento y posteriormente se dializan a través de una membrana cuyo tamaño de poro es de 12 kDa, para obtener los péptidos de bajo peso molecular (1, 55).

Los primeros estudios sobre los EDL en México y que dieron origen a Transferón® fueron realizados por el Dr. Sergio Estrada Parra, un reconocido inmunólogo e investigador Mexicano, en el año de 1970, mismo que en colaboración con otros científicos comenzaron con la elaboración de EDL con fines de investigación, dentro de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. El estudio clínico de los EDL producidos por el Dr. Sergio Estrada comenzó con pacientes con coccidioidomicosis, en los cuales la terapia con EDL trajo grandes beneficios, pues las lesiones características de la infección presentaron notables mejorías. Posteriormente se comenzó con estudios del efecto clínico de los EDL sobre otros padecimientos, los cuales incluyeron infecciones en garganta, oídos y tuberculosis, así como Herpes y dermatitis atópica. Esto resulto ser un parte aguas para el crecimiento en la producción de EDL, así como su registro ante la Secretaria de Saludo como medicamento inmunomodulador y su distribución comercial bajo el nombre de Transferón ®.

Actualmente Transferón® se comercializa a nivel nacional como adyuvante en el tratamiento de diversos padecimientos tales como: coccidioidomicosis anérgica, leishmaniasis, toxoplasmosis, herpes, candidiasis mucocutánea, sinusitis, faringitis, otitis media, tuberculosis, infecciones pediátricas, dermatitis atópica y alergias, ya sea de manera aislada o de forma conjunta con otra terapia (50, 51).

Está demostrado que Transferón® actúa potenciando la respuesta inmunológica de los individuos mediante mecanismos que involucran la participación de células T cooperadoras (CD4), favoreciendo una polarización hacia el perfil Th1, lo que lleva a un incremento considerable en los niveles de IFN- γ , resultando ello de gran importancia en padecimientos causados por microorganismos intracelulares, así como en ciertas infecciones virales como es el caso del Herpes Zooster e infecciones fúngicas. Por otro lado, se tiene evidencia de que la administración de Transferón® disminuye la secreción de citocinas inflamatorias causantes de daño tisular como la IL-8 y la IL-6 en cultivos de células epiteliales de córnea (células limbales) estimulados con agentes mitogénicos, además de citocinas características de un perfil Th2, como la IL4 en pacientes con queratitis corneal. Es por ello que se propone que Transferón® podría ejercer un efecto sobre las vías de señalización celular que involucren al factor de transcripción NF- κ B. Por último, se sabe que Transferón® también tiene efecto en la activación de macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y células NK (51, 52, 53, 57).

Con respecto a la caracterización fisicoquímica de Transferón®, en el trabajo publicado por *Medina Rivero et al.* en el año 2014. se obtuvo el perfil cromatográfico mediante exclusión molecular (SE-UPLC), en el que se encontraron al menos 8 poblaciones diferentes cuyo peso molecular se encuentra en el intervalo 0.2 -17 kDa, y cuyos parámetros cromatográficos (volumen de elución y área de cada pico) presentaron alta consistencia entre 10 diferentes lotes analizados (figura 4).

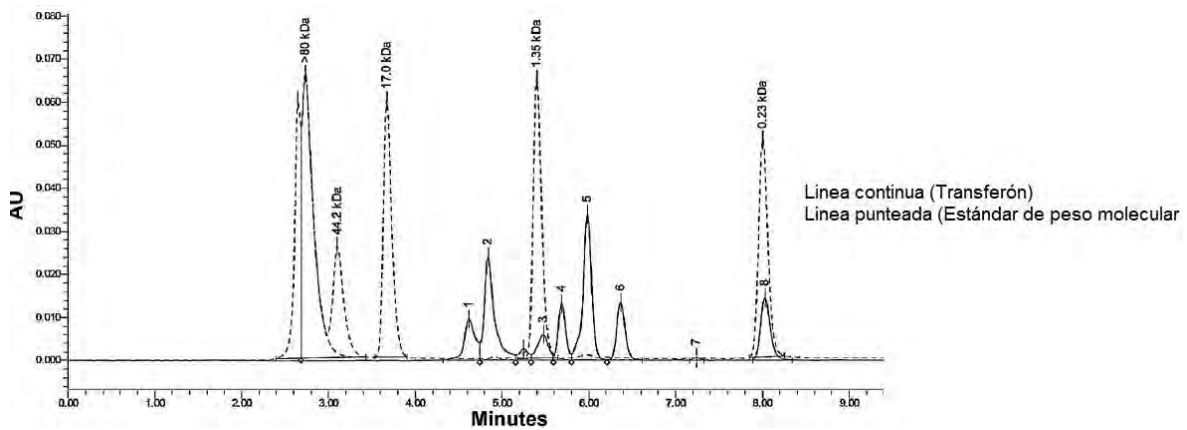


Figura 4: Perfil cromatográfico de Transferón® obtenido por cromatografía de exclusión molecular (SEC-UPLC). Medina Rivero et al.

Nota: Columna Acquity BEH 125 (Waters). Buffer fosfato monobásico de sodio/fosfato dibásico de sodio 0.05 M más cloruro de sodio 0.150 M, pH 6.8, flujo: 0.4 mL/min (flujo isocrático), tiempo de corrida 15 min.

De igual forma se realizaron análisis del contenido de péptidos por la técnica del ácido bicinconínico (BCA) en los que se determinó en promedio 0.433 mg/mL de proteína total por unidad, así como análisis del contenido de endotoxina y potencia biológica, empleando para ello la estimulación de cultivos de células Jurkat con diluciones seriadas de Transferón® y determinando la cantidad de IFN- γ producida después de la incubación por 72 horas mediante *ELISA* (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Los resultados mostraron consistencia en todas las pruebas realizadas para los 10 lotes de Transferón® analizados, lo que indica el proceso de producción se encuentra estrictamente controlado y es robusto, a pesar de tratarse de un producto que dada su naturaleza podría dar lugar a alta variación en los parámetros de control entre diferentes lotes.

Por último y con respecto a la seguridad de Transferón®, es importante mencionar que hasta la fecha no se han reportado efectos adversos serios como consecuencia de su uso. En un estudio realizado, solo el 1.9 % de los pacientes presentó algún efecto adverso leve como consecuencia del tratamiento de Transferón®, estos incluyen: dolores de cabeza, salpullido, fatiga, escurrimiento nasal y tos (56).

2. JUSTIFICACIÓN:

Transferón® al ser un producto bioterapéutico utilizado en el tratamiento de diversos padecimientos debido a su acción inmunomoduladora, registrado y regulado por la Secretaría de Salud, requiere una amplia caracterización, así como un proceso de producción consistente basado en buenas prácticas de fabricación. Por lo tanto, el diseño y desarrollo de nuevos métodos para el análisis de muestras de proceso y producto terminado de Transferón® así como el empleo de nuevos ensayos biológicos, permitirían encontrar la relación entre su composición y su mecanismo de acción. Es por ello que en el presente trabajo se realizó el aislamiento, caracterización y evaluación de la función biológica de las diferentes fracciones de Transferón®, esto último mediante un modelo que consiste en la expresión de IFN- γ en células Jurkat, conocido por su capacidad para responder ante la estimulación a diferentes concentraciones de Transferón®.

3. HIPÓTESIS:

Dado que Transferón® es una mezcla compleja de péptidos capaz de inducir la secreción de IFN- γ al incubarse con células Jurkat; se podrá identificar mediante este modelo biológico a la fracción con mayor actividad de Transferón®.

4. OBJETIVOS:

4.1 Objetivo general:

El presente trabajo tiene como propósito realizar el fraccionamiento de Transferón® mediante FPLC y evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas de mediante un modelo *in vitro* basado en la secreción de IFN- γ en un cultivo de células Jurkat.

4.2 Objetivos particulares:

- 1) Seleccionar una técnica cromatografía adecuada para aislar las diferentes poblaciones moleculares de Transferón® a partir de los principios de separación por exclusión molecular, interacción hidrofóbica e intercambio iónico, a fin de establecer el método más adecuado para obtener fracciones bien definidas.
- 2) Realizar el fraccionamiento de 3 diferentes lotes de Transferón® con el principio cromatográfico y condiciones seleccionadas.
- 3) Evaluar en cada fracción obtenida el contenido de endotoxina, la carga microbiana, la identidad mediante SE-UPLC y SE-FPLC, el contenido total de péptidos por el método de BCA y medición de absorbancia a 280 nm.
- 4) Realizar la evaluación biológica de las fracciones de Transferón® mediante un modelo *in vitro*, evaluando la producción de IFN- γ en un cultivo de células Jurkat e identificar la o las fracciones que presenten actividad biológica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 Estandarización del método cromatográfico para fraccionamiento:

El equipo empleado para el fraccionamiento consiste en un cromatografo de líquidos (*FPLC*, por sus siglas en inglés), el cual está diseñado específicamente para la purificación de mezclas peptídicas y proteicas, pues cuenta con un módulo que permite realizar la colecta de los diferentes picos del cromatograma de manera individual. El equipo es controlado mediante el software *Unicorn®*, mismo que permite el manejo y monitoreo en tiempo real de todos los parámetros de corrida, así como la ejecución de métodos de manera programada y las herramientas de análisis y procesamiento de los datos obtenidos. En la figura 5 se esquematizan los componentes del módulo principal del cromatografo utilizado.

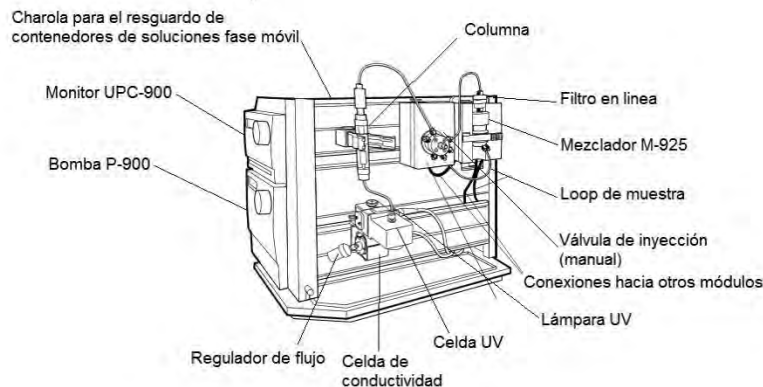


Figura 5: Esquema de los componentes que conforman el módulo principal del equipo cromatográfico para separación y purificación de proteínas. Imagen tomada del Manual de usuario del sistema. Ed. A (GE-Amersham Biosciences AKTA FPLC®).

5.2 Lote piloto de Transferón® (14D12-A):

Para realizar los ensayos correspondientes a la estandarización del método cromatográfico para el fraccionamiento se utilizó el lote 14D12-A, el cual fue producido específicamente para fines de investigación interna. Este lote fue sometido a un proceso de liofilización y evaluado con base en las pruebas de calidad rutinarias que se realizan para liberación de producto (identidad, contenido

peptídico, contenido de endotoxina bacteriana y potencia biológica), cumpliendo con los criterios de aceptación en todas ellas.

5.3 Principios cromatográficos empleados para el análisis de Transferón®:

Se realizó la caracterización del perfil cromatográfico de Transferón® utilizando los principios de: exclusión molecular, interacción hidrofóbica, intercambio aniónico e intercambio catiónico, cada uno bajo diferentes condiciones de corrida, las cuales se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Principios cromatográficos y condiciones empleadas para la caracterización y estandarización del método de fraccionamiento de Transferón® por FPLC.

Principio cromatográfico	Columna/resina empleada	Condiciones de corrida
Exclusión molecular	<i>Superdex Péptide 10/300 GL (GE Healthcare®)</i>	Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 300 mM pH = 7.0
	<i>Ultrahydrogel 500 (Waters®)</i>	Buffer fosfatos 51.7 mM más cloruro de sodio 103 mM pH = 7.0
Interacción hidrofóbica	<i>XK 16/20 GL/ Butil Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare®)</i>	Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM más sulfato de amonio 1.7 M, pH = 7.0 Fase móvil de elución: Buffer de fosfatos 50 mM, pH = 7.0
Intercambio aniónico	<i>XK 16/20 GL /DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare®)</i>	Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 2.0
		Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 7.0
		Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 10.0
		Fase móvil de elución: Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 0.5 M, pH 7.0
Intercambio catiónico	<i>XK 16/20 GL/CM Sepharose Fast Flow (GE Healthcare®)</i>	Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 2.0
		Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 7.0
		Fase móvil de interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 10.0
		Fase móvil de elución: Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 0.5 M, pH 7.0

Nota: Además de las condiciones mencionadas en la tabla, también se realizaron corridas variando el volumen de inyección de muestra con el fin de determinar la capacidad máxima de carga de las columnas empleadas.

5.4 Condiciones de corrida:

Las corridas cromatográficas se realizaron bajo las condiciones de flujo, presión y cantidad de muestra recomendadas por los fabricantes de las columnas y resinas empleadas. Las etapas de análisis en cada una de las inyecciones cromatográficas se programaron empleando el software *Unicorn 5.0*® como se menciona a continuación:

Arranque: Se da inicio al flujo de la fase móvil a través del sistema, se aumenta este de manera progresiva hasta llegar al flujo requerido en cada caso.

Equilibrio: La fase móvil con la que se llevará a cabo la interacción proteína-resina se hace pasar a través de todo el sistema de manera constante, de tal modo que la columna presente las mismas condiciones de la fase móvil (pH, fuerza iónica, temperatura).

Inyección de la muestra: La mezcla peptídica a separar se inyecta en el sistema y es arrastrada por la fase móvil hacia la columna donde pasa a través de esta. Las moléculas que establecen alguna interacción con la resina se retienen, mientras que las moléculas que no lo hacen, salen de la columna.

Elución: Se lleva a cabo la ruptura de la interacción entre moléculas y resina, así como la salida de estas del sistema cromatográfico mediante el empleo de una fase móvil secundaria que presenta condiciones de pH y fuerza iónica diferentes a las empleadas en la fase móvil de interacción; excepto cuando el principio de separación es por exclusión molecular, donde generalmente la elución se realiza sin necesidad de emplear una fase móvil secundaria, lo cual se denomina como flujo isocrático.

5.5 Selección del método cromatográfico y fraccionamiento:

Se determinó el principio de exclusión molecular con la columna *Ultrasphere 500* (Waters®) como el más viable para realizar el fraccionamiento de diferentes lotes de Transferón®, debido a que presenta un mejor desempeño en cuanto a la resolución del perfil cromatográfico y a que permite obtener un mayor número de

fracciones definidas. Estas observaciones se describen a detalle en la sección de resultados (Ver numeral 6).

5.6 Tratamiento de los lotes de Transferón® a fraccionar:

Se fraccionaron varias muestras de Transferón® correspondientes a los lotes 13C09, 13E16 y 14D12-A, los cuales fueron producidos en los años 2013 y 2014 respectivamente. Estos lotes cumplieron con los criterios de aceptación en las pruebas de control de calidad realizadas para la liberación del producto. Para el fraccionamiento se tomaron 30 muestras liofilizadas de cada uno de ellos y se reconstituyó su contenido en 1 mL de agua para fabricación de producto inyectable Tipo 1 (*MilliQ®*). Se determinó el contenido peptídico de la solución resultante de cada lote mediante medición de absorbancia a 280 nm y se realizó el ajuste de concentración de modo tal que la absorbancia fuera muy similar entre lotes. Posteriormente las soluciones reconstituidas filtraron por membranas de 0.22 µm (*Ultrafree-Millipore®*) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.7 Preparación de reactivos para FPLC y limpieza del equipo:

Se llevó a cabo una limpieza y sanitización del sistema cromatográfico mediante infusión de una solución de hidróxido de sodio 0.5 N durante al menos 5 volúmenes de columna y posteriormente realizando lavados con agua tipo 1 hasta que la señal correspondiente a la conductividad generada por el hidróxido de sodio decreciera a nivel basal. En la tabla 3 se describe como se realizó la preparación de los reactivos requeridos para las corridas de fraccionamiento y limpieza del equipo.

Tabla 3: Reactivos empleados para realizar el fraccionamiento de Transferón® mediante FPLC.

Reactivo	Uso	Concentración/ composición	Preparación
Agua tipo 1 Para fabricación de inyectables	Lavado del equipo, preparación de soluciones	Resistividad: mayor a 18MΩ/cm Carbono orgánico total: menor a 10 ppb Endotoxina: menor a 0.03 UE/mL	Obtenida a partir de un sistema de purificación (<i>Milli-Q®</i>)
Buffer fosfatos más cloruro de sodio pH 7.0	Fase móvil	Fosfato monobásico de sodio monohidratado: 0.0317M	Se pesaron 4.37 g de fosfato monobásico monohidratado de sodio, 2.83 g de fosfato dibásico anhidro de sodio y 6.05 g de

Tabla 3 (continuación): Reactivos empleados para realizar el fraccionamiento de Transferón® mediante FPLC

		Fosfato dibásico de sodio anhidro: 0.02M Cloruro de sodio: 0.1037 M	cloruro de sodio. Se disolvió en agua tipo 1 y se llevó al aforo a 1L. Se determinó pH y conductividad, ajustando a pH de 7.0
Hidróxido de sodio	Sanitización y regeneración de columna	0.5 N	Se pesaron 20.0 g de hidróxido de sodio y se adicionó agua hasta aforar a 1.0 L
Etanol	Almacenamiento columna	20% Etanol absoluto, 80% agua tipo 1	Para 1.0 L se adicionaron 200 mL de etanol absoluto y después se llevó a volumen con 800 mL de agua tipo 1.

Nota: Los reactivos preparados se filtraron mediante membranas de 0.22 µm previamente a su uso en el equipo.

5.8 Fraccionamiento y colecta de fracciones:

Se llevaron a cabo 15 corridas de fraccionamiento y colecta por cada lote de Transferón® mediante el principio de exclusión molecular, empleando una columna *Ultrahydrogel 500* y utilizando como fase móvil el buffer descrito en la tabla 3, a flujo isocrático de 0.6 mL/min y temperatura ambiente, inyectando en cada corrida 50 µL de la solución originada de las unidades reconstituidas. Previamente a las corridas de fraccionamiento, se realizó una corrida piloto con cada lote a fraccionar a fin de determinar los volúmenes óptimos par inicio y fin de la colecta para cada fracción. En la tabla 4 se muestran los intervalos de colecta para cada fracción expresados como volumen de elución.

Tabla 4: Intervalos de colecta promedio entre los 3 lotes de Transferón®

Fracción	Volumen inicio colecta (mL)	Volumen fin de colecta (mL)	Volumen colectado por corrida (mL)
Fracción 1	10.05 ± 0.05	11.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05
Fracción 2	11.6 ± 0.0	12.35 ± 0.05	0.75 ± 0.05
Fracción 3	13.45 ± 0.05	14.0 ± 0.0	0.55 ± 0.05
Fracción 4	14.25 ± 0.05	15.1 ± 0.1	0.85 ± 0.05
Fracción 5	15.70 ± 0.1	16.95 ± 0.05	1.2 ± 0.1
Fracción 6	17.75 ± 0.25	18.85 ± 0.05	1.1 ± 0.2

Notas:

- 1) ± indica la variación en volumen existente entre lotes.
- 2) Los valores expresados indican los mililitros transcurridos desde que se realizó la inyección, a flujo de 0.6 mL/min

5.9 Tratamiento y caracterización fisicoquímica de las fracciones obtenidas:

5.9.1 Remoción de endotoxina bacteriana:

Para remover la endotoxina bacteriana proveniente del proceso de fraccionamiento se sometieron las fracciones colectadas de cada lote a filtración por ultracentrifugación, para lo cual el volumen total colectado de cada fracción se colocó en tubos provistos de una membrana cuyo tamaño de poro es de 10 kDa (*Amicon Ultra®*, Millipore) y se llevaron 4500 x g durante 15 minutos. Terminado el ciclo de centrifugación, se recuperó en condiciones de esterilidad el filtrado de cada tubo y se colocó en tubos estériles y libres de endotoxina. Se realizó una cuantificación de proteínas a las fracciones antes y después del ultrafiltrado para verificar que no existiera un fenómeno de retención de masa en las membranas de ultrafiltración.

Posteriormente y para corroborar la eficacia del proceso de ultrafiltración, se llevó a cabo la determinación del contenido de endotoxina en las fracciones mediante el kit comercial *Limulus Amebocyte Lysate (Charles River®)*, el cual se basa en una serie de reacciones enzimáticas que se llevan a cabo entre el lipopolisacárido y el lisado obtenido de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* y que derivan en la formación de un gel apreciable a simple vista, permitiendo la detección de hasta 0.125 unidades de endotoxina por mL de muestra. En la figura 6 se muestra el procedimiento general con el cual se llevó a cabo la determinación del contenido de endotoxina de las fracciones colectadas utilizando dicho kit comercial.

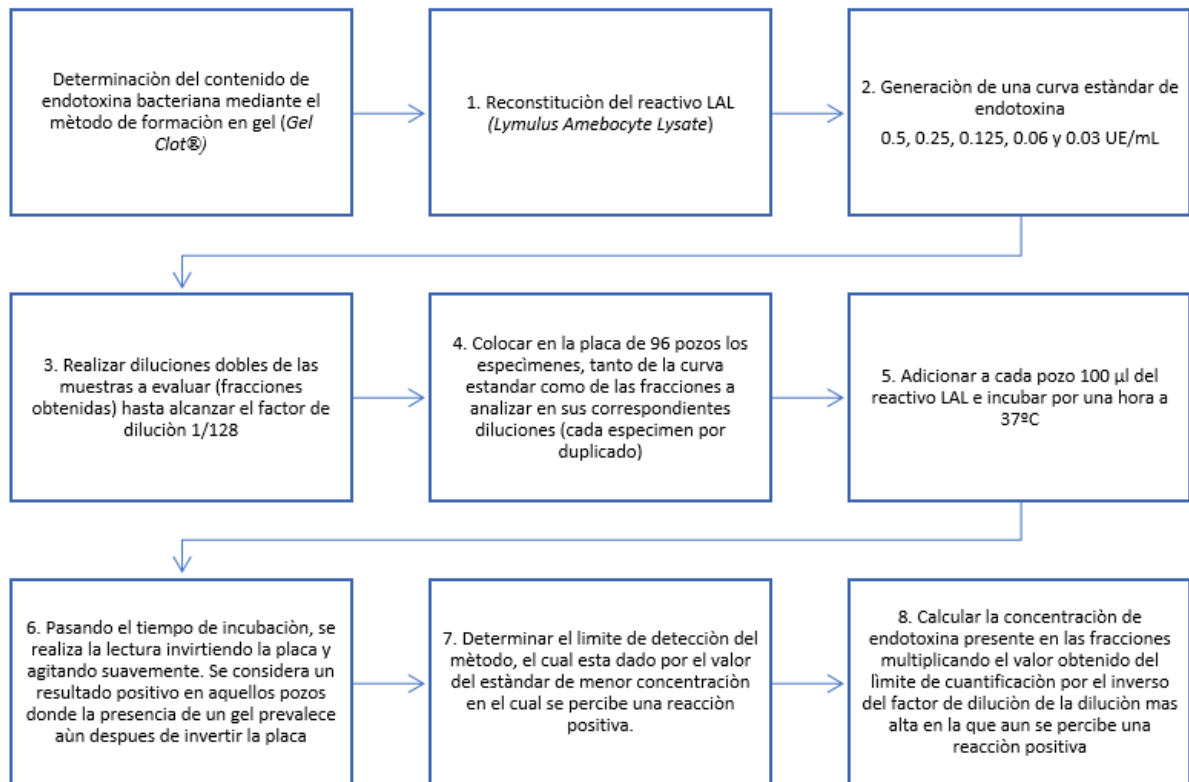


Figura 6: Metodología para la determinación del contenido de endotoxina bacteriana mediante el método de "Gel clot®"

5.9.2 Esterilización:

Las fracciones de Transferón® se esterilizaron por filtración para evitar cambios en la integridad de los péptidos debido a la aplicación de calor. El proceso se realizó en una campana de flujo laminar, donde el volumen total de cada fracción se colocó por separado en una jeringa desechable y estéril de 20.0 mL (BD®), a la cual se adaptó previamente una unidad de filtración de 0.22 µm (MILLEX® GV- Millipore). Posteriormente, utilizando el embolo de la jeringa se aplicó presión ligera para favorecer el paso del contenido través de la unidad de filtración, mismo que se colectó en un tubo plástico de 15.0 mL estéril y libre de pirógenos (Corning®).

Se realizó una prueba confirmatoria de esterilidad en la cual se sembraron alícuotas de las fracciones filtradas en caldo tripticaseína soya (preparado y esterilizado previamente conforme a las instrucciones del fabricante) y se incubaron a 37°C,

realizando lecturas a las 24, 48 y 72 horas. Adicionalmente se incluyó un control positivo de crecimiento microbiano para verificar el correcto funcionamiento del medio de cultivo, el cual consistió en una alícuota de suspensión bacteriana cultivada bajo las mismas condiciones. También se incluyó un control negativo que consistió en la incubación de medio de cultivo solamente. Pasado el tiempo de incubación se realizó la comparación visual con respecto a los controles respecto a la turbidez del medio, tomando este fenómeno como indicio de crecimiento microbiano.

5.9.3 Identidad:

a) UPLC:

Se analizaron las fracciones obtenidas en un cromatografo *Acquity UPLC® (Waters)* mediante el principio de exclusión molecular, utilizando una columna BEH 125 (intervalo de separación 1-80 kDa) y como fase móvil de corrida un buffer de fosfato de sodio monobásico/ fosfato de sodio dibásico 50 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6.81, a flujo isocrático de 0.4 mL/min y temperatura de 30°C. Cada fracción se analizó por duplicado y con un tiempo de corrida de 12 minutos. Se corrió como control un estándar interno de Transferón®, del cual se inyectaron 3 réplicas.

Los picos cromatográficos de Transferón® se caracterizaron en cuando a peso molecular a través del uso de un estándar comercial de peso molecular (*Biorad Gel Filtration Standard®*), analizado de igual forma por triplicado. Del mismo modo se realizó la inyección de una alícuota del agua utilizada para la preparación de las fases móviles (blanco de sistema) con el fin de descartar interferencias en el sistema cromatográfico.

b) FPLC:

Para el análisis individual de las fracciones colectadas en el equipo *FPLC*, se utilizaron las mismas condiciones de corrida del fraccionamiento: principio de exclusión molecular, columna *Ultrasphere 500* y como fase móvil un buffer de fosfato monobásico/dibásico de sodio 0.052 mM y cloruro de sodio 0.1037 M, pH

7.0, a flujo isocrático de 0.6 mL/min, inyectando un volumen de 50 μ L de cada fracción. De igual forma se analizó también un estándar interno de Transferón® así como un estándar comercial de peso molecular (*Biorad Gel Filtration Standard*®).

5.9.4 Determinación del contenido peptídico:

a) Por medición de absorbancia a 280 nm:

Para cuantificar el contenido proteico total de las fracciones de Transferón® a 280 nm, se colocaron 2.5 μ L de cada fracción directamente en el microplato adaptador para el espectrofotómetro “*Epoch*®”, el cual es operado mediante el software “*Gen5*®”. Se realizó la lectura de cada fracción por duplicado, obteniendo así la media de la concentración peptídica y el coeficiente de variación entre réplicas. Como blanco se empleó la fase móvil utilizada en la obtención de las fracciones.

b) Por el método del ácido bicinconínico (BCA):

Se realizó la cuantificación del contenido de péptidos por el método de BCA en cada una de las fracciones, así como en las soluciones sin fraccionar de cada lote, el cual se basa en una reacción colorimétrica de reducción. Este método es altamente sensible ya que es capaz de detectar hasta 0.5 μ g/mL de proteína, presentando interferencia con pocos analitos (59). La determinación se realizó con el kit comercial *Pierce*® (*Thermo Scientific*) con base en las instrucciones del fabricante. En la figura 7 se describe de manera general el procedimiento para realizar esta determinación:

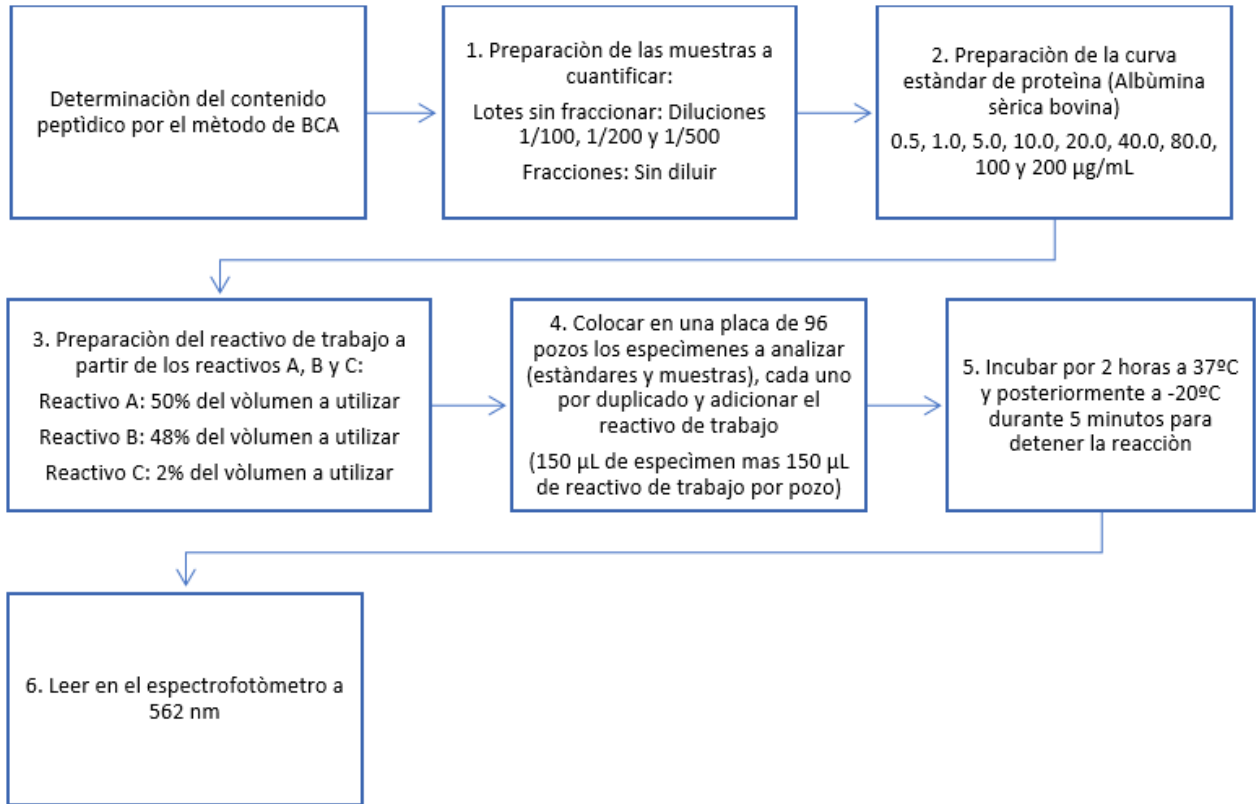


Figura 7: Metodología para la determinación del contenido peptídico por el método de BCA, empleando el kit "Pierce®".

Nota:

Reactivo A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, tartrato de sodio e hidróxido de sodio.

Reactivo B: Ácido bicinconínico

Reactivo C: Sulfato cúprico

5.9.5 Ensayo biológico para la estimulación de la producción de INF- γ en cultivo de células Jurkat:

El ensayo biológico se realizó en un cultivo de células Jurkat clona E6 (ATCC®), las cuales se expandieron en medio RPMI 1640 (ATCC®) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco®) al 10% hasta alcanzar el número de células requerido (aproximadamente 60 millones). Una vez obtenida la cantidad necesaria de células, se realizó la cosecha de las mismas y se centrifugaron a 700 rpm, durante 5 min. Se resuspendió el botón celular en medio RPMI para formar una suspensión de trabajo cuya densidad requerida era de 6×10^5 células por mililitro.

Los estímulos para el cultivo de células Jurkat consistieron en cada una de fracciones obtenidas de los lotes 13C09 y 14D12 así como las soluciones de estos lotes sin fraccionar, evaluados en diluciones decimales seriadas con medio RPMI. Estas diluciones se prepararon a partir del valor determinado en la cuantificación de péptidos por BCA y fueron las siguientes: 20 µg/mL, 2.0 µg/mL, 200 ng/mL, 20 ng/mL, 2.0 ng/mL, 200 pg/mL y 20 pg/mL. También se preparó una dilución de Concanavalina A (ConA, *Sigma-Aldrich*®) a 50 µg/mL como control positivo de estimulación para evaluar la funcionalidad del cultivo, dada la capacidad de ConA para inducir la producción de IFN-γ en linfocitos T. También se incluyó un control de estimulación con la fase móvil empleada para el fraccionamiento, así como un control de sistema en el que únicamente se colocaron las células en medio RPMI, sin ningún estímulo. Estos dos últimos controles fueron diseñados para descartar interferencias en la producción de INF-γ por parte del método de fraccionamiento y por el modelo biológico, respectivamente. Todos los estímulos y controles se evaluaron por triplicado, colocando por cada pozo 500 µL de la suspensión celular y 500 µL de la dilución correspondiente del estímulo o control. Es importante mencionar que las diluciones se prepararon al doble de la concentración requerida en el cultivo pues se contempló la dilución 1:2 que se realiza en el pozo al mezclar volúmenes iguales de células y estímulos. En la figura 8 se explica de manera general el procedimiento para el ensayo biológico de estimulación:

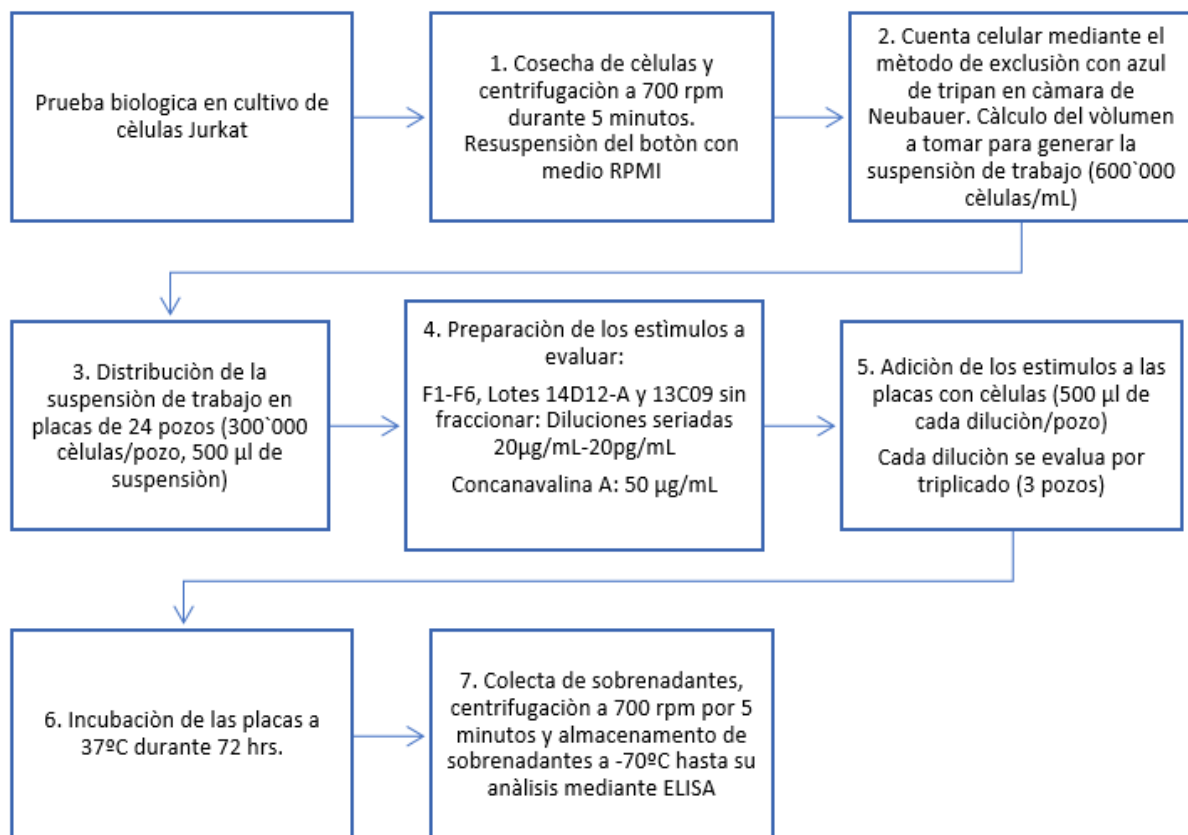


Figura 8: Metodología empleada para realizar el ensayo biológico de estimulación en cultivo de células Jurkat.

Nota: Las diluciones de estímulo (paso 4) se prepararon de tal forma que se tuviese el doble de la concentración requerida, debido a la dilución que se realiza al adicionarse en el pozo con la suspensión celular (500 µL suspensión celular + 500 µL estímulo)

5.9.6 Determinación de la cantidad de IFN- γ producida en los sobrenadantes recuperados por *ELISA*:

El análisis del contenido de IFN- γ en los sobrenadantes recuperados del ensayo biológico en cultivo de células Jurkat se realizó mediante la técnica de *ELISA*, empleando el kit comercial *Opt EIA® (BD)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El descongelamiento de los sobrenadantes se realizó de manera gradual a 4°C para favorecer la estabilidad de la molécula a determinar. En la figura 9 se resume la secuencia de pasos que conlleva esta metodología:

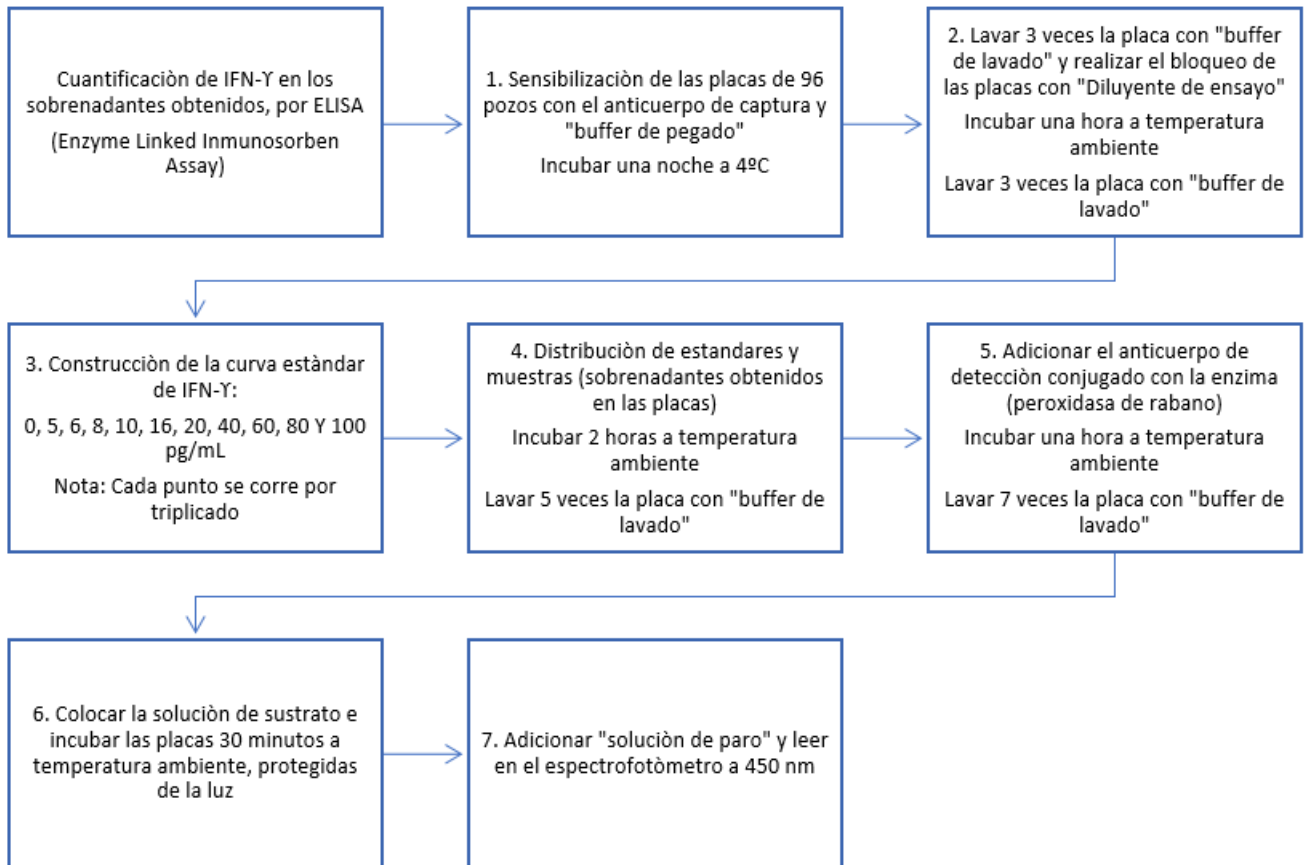


Figura 9: Metodología para realizar la determinación del contenido de IFN- γ en los sobrenadantes obtenidos del ensayo biológico de estimulación

6 RESULTADOS:

6.1 Estandarización del método cromatográfico para el fraccionamiento de Transferón®:

6.1.1 Exclusión molecular (Columna *Superdex Péptide 10/300 GL*®):

Empleando una columna *Superdex Peptide 10/300 GL* (GE Healthcare®), la cual presenta un intervalo óptimo de separación entre 100 y 7000 Da, se obtuvo un perfil cromatográfico conformado por 10 picos (Figura 10). Sin embargo, y como se puede apreciar en el perfil obtenido, algunos de los picos se encuentran muy próximos entre sí (principalmente en los picos 1 – 6 y que corresponden a los de mayor peso molecular), lo que dificultaría la obtención de picos aislados durante el fraccionamiento.

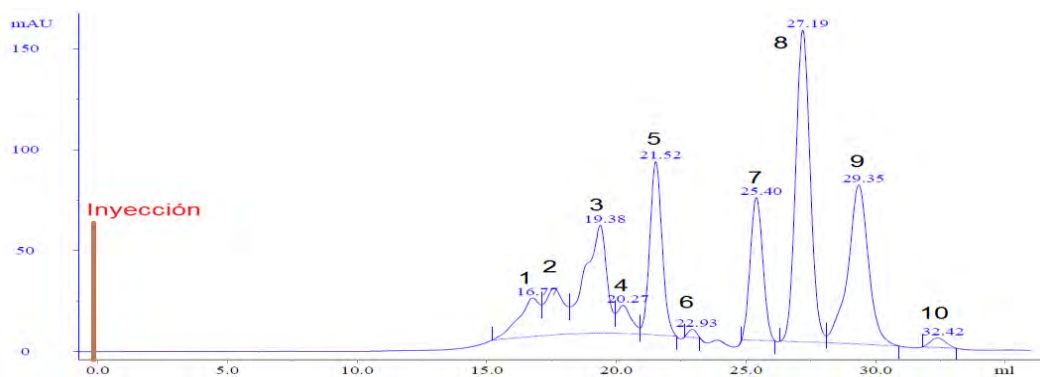


Figura 10: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por exclusión molecular con la columna *Superdex Peptide 10/300 GL*.

Fase móvil: Buffer fosfatos 50 mM y cloruro de sodio 300 mM, pH 7.0. Los números en color negro refieren a la identificación de cada pico, mientras que los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada uno.

Con respecto al análisis de un estándar comercial conformado por una mezcla de proteínas definidas en cuanto a peso molecular (Figura 11), el cromatograma obtenido muestra que las proteínas de alto peso molecular co-eluyeron en un solo pico (tiroglobulina, gamma-globulina), lo mismo para ovoalbúmina y mioglobina que co-eluyeron en un solo pico, mientras que vitamina B12, se logró resolver como

un pico aislado. Lo anterior permite establecer un intervalo de separación entre 17 y 1.35 kDa.

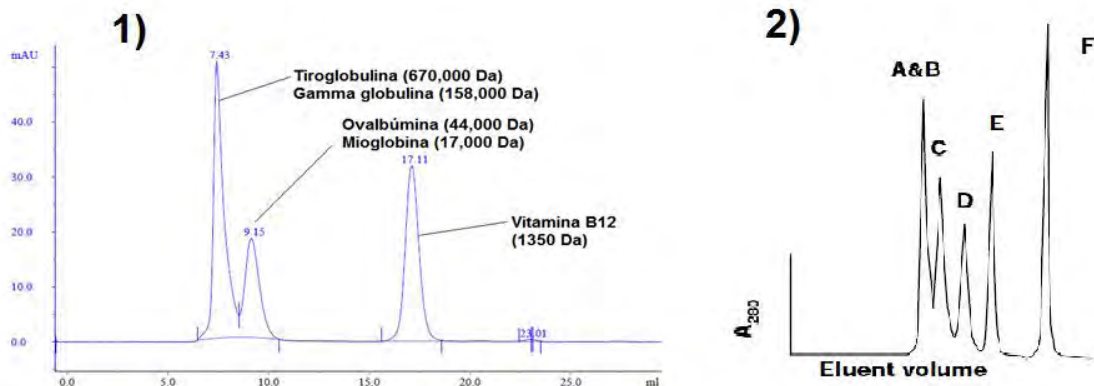


Figura 11: Perfiles cromatográficos del estándar comercial de peso molecular (Biorad Gel Filtration Standard®). Obtenido con una columna Superdex Peptide 10/300 GL. (1) y el reportado por el fabricante (2).

- 1) Fase móvil: Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 300 mM, pH 7.0. Los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada pico.
- 2) Columna Bio-Sil SEC 125, Fase móvil: Buffer fosfatos 100 mM más cloruro de sodio 150 mM, pH 6.8, Flujo: 1.0 mL (min). A: Agregados de proteínas, B; Tiroglobulina, C: gamma-globulina, D: Ovoalbúmina, E: Mioglobina, F: Vitamina B12

6.1.2 Exclusión molecular (Columna *Ultrahydrogel 500*®):

Empleando una columna *Ultrahydrogel 500* (Waters®), cuyo intervalo óptimo de resolución se encuentra entre 1 y 400 kDa, se obtuvo un perfil cromatográfico conformado por 6 picos definidos, obtenidos de la inyección de Transferón® y los cuales presentan una adecuada separación entre estos como se aprecia en la figura 12. Esto facilitaría la obtención de picos aislados durante el fraccionamiento, además de una mayor riqueza en cada uno (intensidad de la señal) con respecto a la columna *Superdex Peptide 10/300 GL*, probada anteriormente.

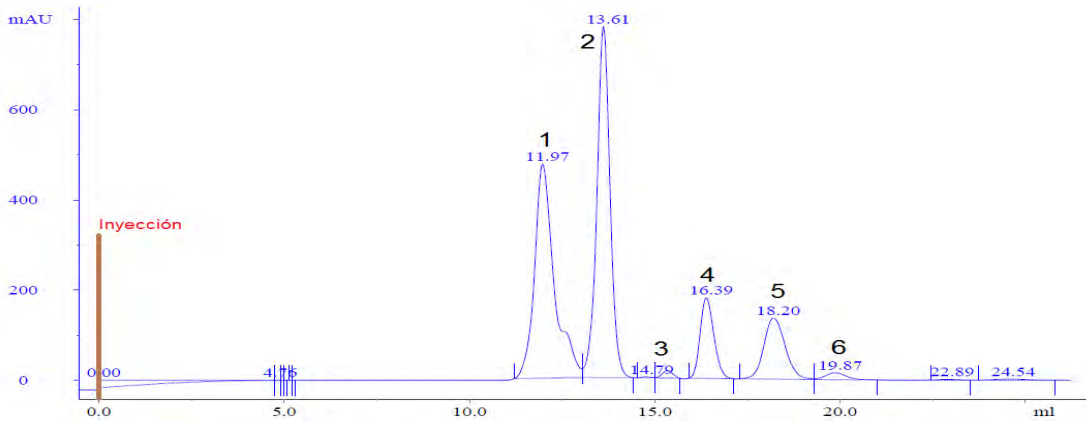


Figura 12: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por exclusión molecular con la columna Ultrahydrogel 500.

Fase móvil: Buffer fosfatos 51.7 mM más cloruro de sodio 103 mM, pH 7.0. Los números en color negro refieren a la identificación de cada pico, mientras que los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada uno.

Con respecto al análisis del estándar comercial de peso molecular (Figura 11), el cromatograma obtenido muestra que las proteínas de alto peso molecular co-eluyeron en un solo pico, mientras que vitamina B12, se logró resolver como un pico único. Lo anterior permite establecer un intervalo de separación entre 17 y 1.35 kDa, por lo que resultaría adecuada para el fraccionamiento de Transferón®.

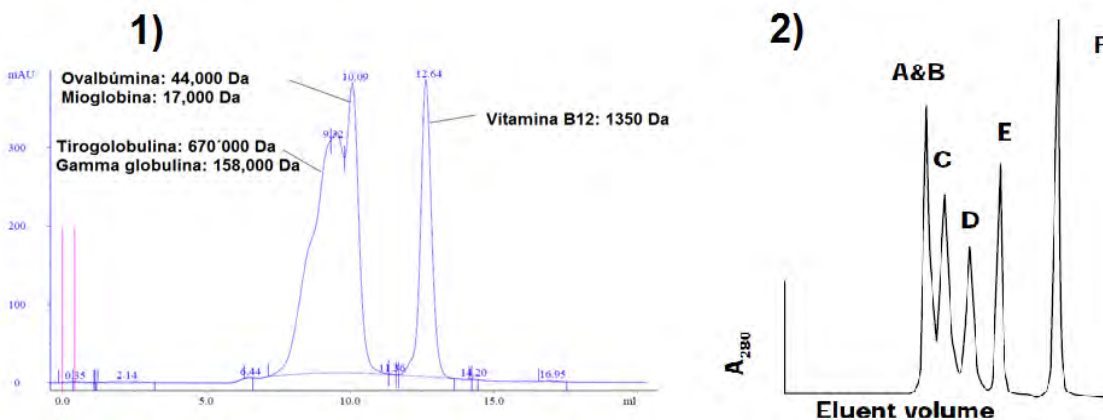


Figura 13: Perfiles cromatográficos del estándar comercial de peso molecular (Biorad® Gel Filtration Standard). Obtenido con una columna Ultrahydrogel 500 (1) y el reportado por el fabricante (2).

- 1) Fase móvil: Buffer fosfatos 51.7 mM más cloruro de sodio 103 mM, pH 7.0. Los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada pico.
- 2) Véase figura 11, punto 2 de la descripción.

6.1.3 Interacción hidrofóbica (Columna XK 16/29, resina Butil Sepharose Fast Flow®) :

En el perfil cromatográfico obtenido por el principio de interacción hidrofóbica mediante una resina *Butil Sepharose* (GE Healthcare®) se aprecian 5 picos (Figura 14), en el cual los picos 1 y 2 son los mayoritarios, los cuales aparecieron antes del decremento en la conductividad dado por la aplicación de la fase móvil de elución. Por otro lado, los picos 3, 4 y 5, que presentan menor área y altura, eluyeron en el transcurso de la aplicación de la fase móvil de elución y del decremento de la conductividad.

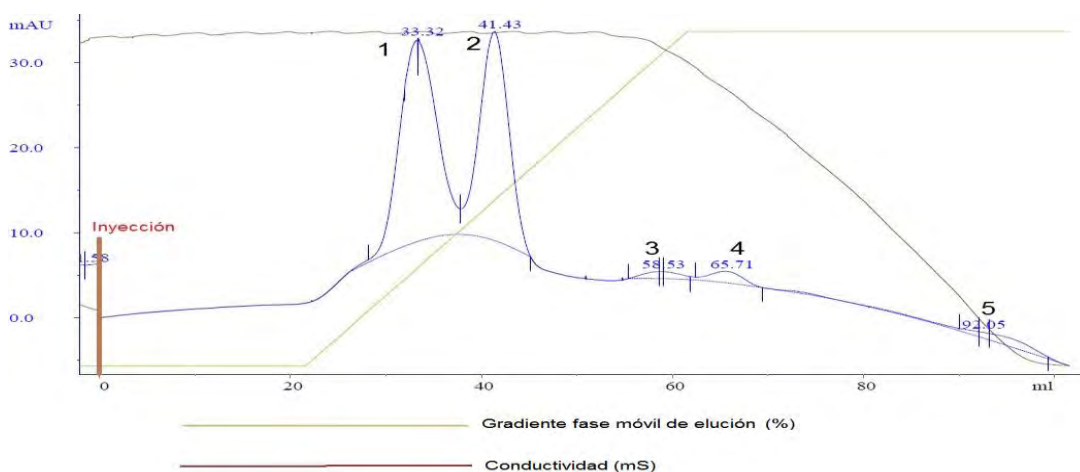


Figura 14: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por interacción hidrofóbica con una columna XK 16/29 y la resina Butil Sepharose 4 Fast Flow.

Fase móvil interacción: Buffer fosfatos 50 mM más sulfato de amonio 1.7 M, pH 7.0. **Fase móvil elución:** Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.0. Los números en color negro refieren a la identificación de cada pico, mientras que los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada uno.

Este comportamiento se encuentra determinado por el grado de interacción que establecen las moléculas que conforman Transferón® con la resina empleada y el cual es reflejo de la hidrofobicidad de las mismas. De esta forma, las moléculas que conforman a los picos 1 y 2 presentaron poca o nula interacción con los grupos no polares de la resina empleada, lo que refleja su naturaleza hidrofílica. Por otro lado, las moléculas que conforman a los picos 3, 4 y 5 establecieron algún grado interacción con la resina, eluyendo durante el cambio de fuerza iónica en el medio, por lo que estas poblaciones moleculares tienden a presentar un carácter más hidrofóbico.

Debido a lo anterior y a que el perfil cromatográfico obtenido sugiere que la mayor parte de las moléculas que conforman Transferón® presenta naturaleza hidrofílica, no resultaría adecuado utilizar el principio de interacción hidrofóbica para realizar la obtención de fracciones.

6.1.4 Intercambio aniónico (resina DEAE Sepharose Fast Flow®):

El perfil cromatográfico obtenido utilizando el principio de intercambio aniónico con la resina *DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare®)* está compuesto por 4 picos, de los cuales los picos 2, 3 y 4 aumentaron su volumen de elución drásticamente a medida que se incrementó el pH del medio. Un comportamiento diferente se observó en el pico mayoritario (pico 1), el cual permaneció constante en cuanto a volumen de elución, presentando únicamente cambios menores en área y altura, bajo pH de 2.0, 7.0 y 10.0. (Ver figura 15 en la siguiente página)

Al tratarse de una resina que funciona como intercambiador aniónico, las moléculas que conforman en su mayoría el pico 1 prácticamente no interaccionan con esta, lo que sugiere un fenómeno de repulsión generada por cargas iguales y salen de la columna sin la necesidad de modificar la fuerza iónica. Por otra parte, las moléculas que conforman los picos restantes establecen interacciones más estables con la resina empleada, las cuales muestran dependencia del pH del medio, debido a la diferencia de cargas generada entre las moléculas y los grupos acoplados a la resina, por lo que la elución ocurre tras el incremento de la fuerza iónica. Este cambio en el patrón de elución a medida que el pH del medio aumenta sugiere la presencia de moléculas con un punto isoeléctrico (pI) entre 2 y 7 y por lo tanto con carga neta negativa a pH alto, lo que favorece la interacción con la resina cuya carga es positiva, mientras que las moléculas que conforman al pico 1 pudieran presentar grupos básicos que a pH alto encuentran con carga positiva (grupos amino) y confiriendo una carga neta positiva, o bien grupos no ionizables (neutros).

Si bien se obtuvieron algunos picos en el perfil cromatográfico que mostraron un comportamiento dependiente de las condiciones de pH en el medio, la mayor parte de los componentes que conforman Transferón® no mostraron una

interacción diferencial con la resina empleada bajo las diferentes condiciones de pH analizadas, por lo que no se consideró el principio de intercambio aniónico como una alternativa para realizar el fraccionamiento.

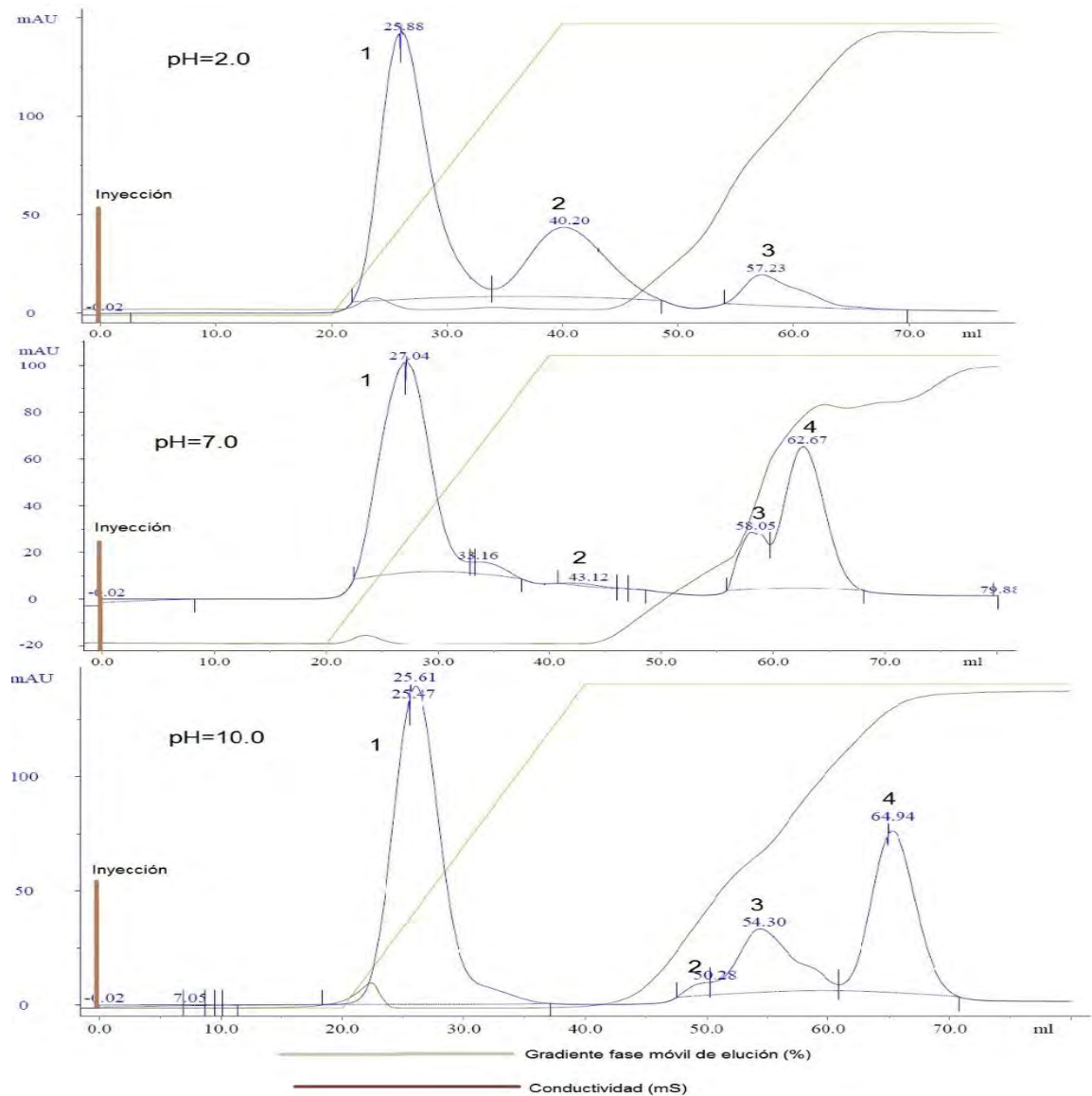


Figura 15: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por intercambio aniónico con una resina DEAE Sepharose Fast Flow.

Fase móvil interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 2.0, 7.0 y 10.0. **Fase móvil elución:** Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 500 mM, pH 7.0. Los números en color negro refieren a la identificación de cada pico, mientras que los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada uno.

6.1.5 Intercambio catiónico (*resina CM Sepharose Fast Flow®*) :

El perfil cromatográfico obtenido con el principio de intercambio catiónico (Figura 16) mostró prácticamente un único pico que se mantuvo constante en todas las condiciones de pH evaluadas, el cual eluyó antes de la aplicación del buffer de elución en todos los casos. Esto es indicio de una nula interacción entre las moléculas que se encuentran en Transferón® y la resina empleada cuyos grupos acoplados presentan carga neta negativa. Debido a que esta variante cromatográfica no permitió obtener ninguna separación en las moléculas que conforman Transferón®, no representa una alternativa para la obtención de fracciones.

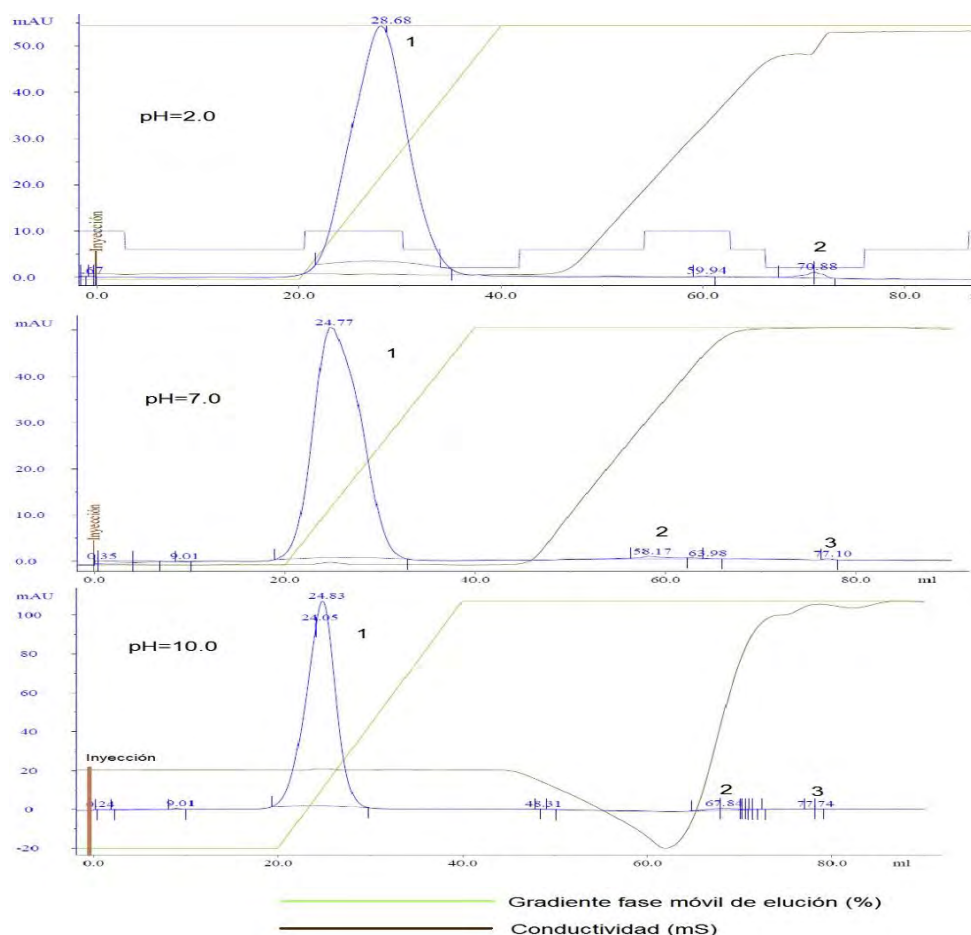


Figura 16: Perfil cromatográfico de Transferón® (lote 14D12-A) obtenido por intercambio catiónico con una resina CM Sepharose Fast Flow.

Fase móvil interacción: Buffer fosfatos 50 mM pH 2.0, 7.0 y 10.0. **Fase móvil elución:** Buffer fosfatos 50 mM más cloruro de sodio 500 mM, pH 7.0. Los números en color negro refieren a la identificación de cada pico, mientras que los números en color azul representan el volumen de elución en mL de cada uno.

6.2 Fraccionamiento de Transferón®:

Dado que el perfil cromatográfico obtenido con el principio de exclusión molecular (columna *Ultrahydrogel 500*®) es el que presenta una mejor definición en los picos que lo conforman, se utilizó dicho principio y condiciones de corrida para realizar el fraccionamiento de 3 lotes de Transferón®.

Los cromatogramas obtenidos revelaron un comportamiento cromatográfico consistente entre lotes. Como ya se había observado, se obtuvo un perfil cromatográfico compuesto por 6 picos, donde el pico mayoritario corresponde al de la fracción 2, mientras que el pico 6 presenta la menor proporción en todos los 3 lotes (Figura 17).

Los parámetros cromatográficos obtenidos entre las diferentes corridas de un mismo lote, así como en la comparación realizada entre diferentes lotes, de igual forma mostraron un comportamiento consistente, principalmente en el volumen de elución, donde se obtuvo la menor variación tanto intra lotes (tabla 5) como inter lotes (tabla 6). Mientras que las variaciones que se obtuvieron en el área y altura de cada pico al realizar la comparación entre lote fueron originadas por diferencias en la concentración de la solución reconstituida obtenida para cada lote.

En la figura 17 se muestran los perfiles cromatográficos representativos de las 15 corridas realizadas para cada uno de los 3 lotes fraccionados, así como la tabla que contiene los parámetros cromatográficos obtenidos entre corridas de un mismo lote (tabla 5) y la comparación de los parámetros cromatográficos entre los 3 lotes (tabla 6).

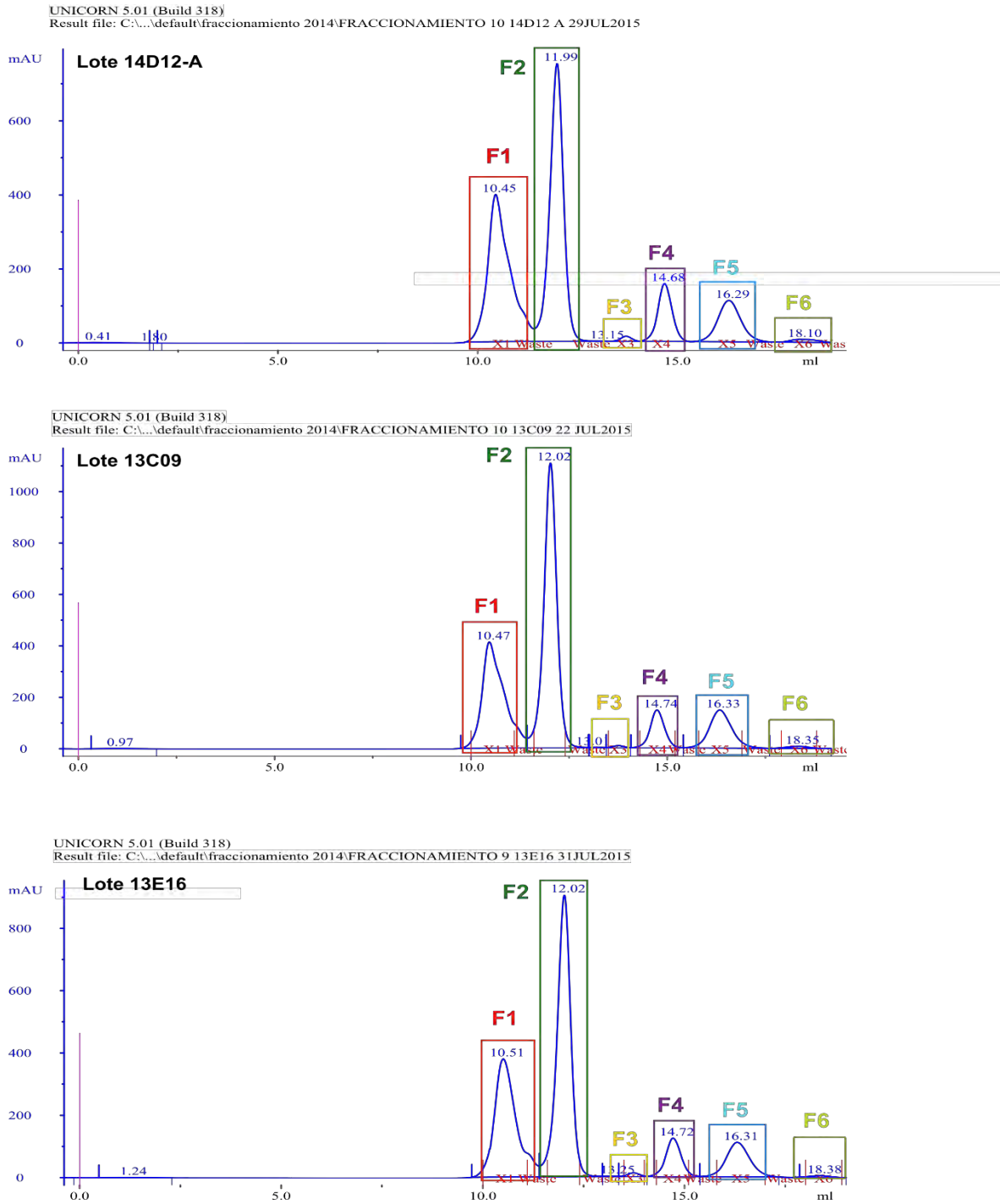


Figura 17: Cromatogramas obtenidos del fraccionamiento de 3 lotes de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16) por el principio de exclusión molecular con una columna Ultrahydrogel 500.

Buffer de corrida: Fosfato de sodio monobásico/dibásico 51.7 mM, cloruro de sodio 103.7 mM, pH 7.0. Volumen de muestra inyectado: 50 µL. Flujo: 0.6 mL/min.

Nota: F1-F6 representa la identificación de las fracciones obtenidas, mientras que los números en azul representan el volumen de elución de cada una.

Tabla 5: Parámetros cromatográficos promedio obtenidos de las 15 corridas de fraccionamiento para cada uno de los 3 lotes de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16) mediante FPLC

Fracción	Volumen de elución (mL)			Altura del pico (mAU)			% Área		
	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	%CV
F1	10.46	0.01	0.12	399.80	20.54	5.14	35.29	1.55	4.39
F2	11.91	0.25	2.06	745.98	53.77	7.21	42.24	0.70	1.65
F3	13.72	0.01	0.10	13.11	0.95	7.26	0.57	0.02	3.72
F4	14.68	0.02	0.16	153.26	10.65	6.95	9.05	0.16	1.73
F5	16.29	0.03	0.18	109.31	9.03	8.26	10.33	0.15	1.43
F6	18.04	0.08	0.44	7.60	0.72	9.49	0.86	0.07	7.60
F1	10.47	0.01	0.05	394.65	13.96	3.54	30.76	0.38	1.22
F2	12.02	0.01	0.12	1069.25	40.79	3.81	49.17	0.91	1.84
F3	13.66	0.28	2.08	7.70	0.34	4.40	0.27	0.01	2.41
F4	14.73	0.03	0.23	142.33	5.06	3.56	7.11	0.13	1.87
F5	16.32	0.04	0.25	142.11	5.75	4.04	11.10	0.19	1.72
F6	18.36	0.04	0.21	7.43	0.46	6.17	0.58	0.04	7.32
F1	10.48	0.01	0.14	337.26	36.87	10.93	31.67	0.44	1.40
F2	12.04	0.03	0.21	875.38	35.40	4.04	49.10	0.42	0.86
F3	13.76	0.03	0.21	11.60	0.35	3.01	0.53	0.02	2.98
F4	14.77	0.05	0.35	123.02	1.98	1.61	7.32	0.04	0.53
F5	16.37	0.07	0.43	112.83	2.16	1.91	10.14	0.11	1.11
F6	18.43	0.07	0.37	6.13	0.38	6.15	0.49	0.04	8.51
	Lote 14D12-A			Nota: DE: Desviación estándar, %CV: coeficiente de variación, mAU: mili unidades de absorbancia.					
	Lote 13C09								
	Lote 13E16								

Tabla 6: Parámetros cromatográficos promedio de los 3 lotes fraccionados de Transferón® (14D12-A, 13C09 y 13E16).

Fracción	Volumen de elución promedio entre 3 lotes (mL)			Altura del pico promedio entre los 3 lotes (mAU)			% Área promedio entre los 3 lotes		
	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	%CV
F1	10.47	0.01	0.10	377.24	28.35	7.51	32.57	1.95	6.00
F2	11.99	0.06	0.46	896.87	132.85	14.81	46.84	3.25	6.94
F3	13.72	0.04	0.30	10.80	2.28	21.09	0.45	0.13	29.51
F4	14.73	0.04	0.25	139.53	12.50	8.96	7.83	0.87	11.08
F5	16.33	0.03	0.20	121.42	14.70	12.11	10.52	0.42	3.97
F6	18.28	0.17	0.92	7.05	0.65	9.27	0.64	0.16	24.89

Nota: DE: Desviación estándar, %CV: coeficiente de variación, mAU: mili unidades de absorbancia.

6.3 Análisis de identidad y pureza de las fracciones obtenidas:

6.3.1 Determinación de identidad y pureza por FPLC:

Se inyectaron cada una de las fracciones obtenidas en el FPLC bajo las mismas condiciones que se utilizaron para obtener las mismas. Esto con el objetivo de evaluar tanto identidad, es decir, la concordancia en los volúmenes de elución entre picos en cada fracción y los picos obtenidos durante la colecta de las mismas, como la pureza de las mismas (la presencia de picos correspondientes a otras fracciones, derivado de un fenómeno de co-elución durante el fraccionamiento). En este sentido y derivado de los resultados obtenidos, se observó que la fracción 1 es la que presentó una mayor pureza, misma que se aprecia como un pico único en el perfil cromatográfico, mientras que en los parámetros cromatográficos obtuvo un porcentaje de área superior al 98% en los 3 lotes (tabla 7). Por otra parte las fracciones 2, 4 y 5 presentaron cada una un pico mayoritario con un porcentaje de área superior al 70% en los tres lotes fraccionados y cuyo volumen de elución corresponde con el obtenido durante el proceso de fraccionamiento. Sin embargo,

se observó también en estas fracciones la presencia de picos co-eluyentes, los cuales coinciden con algunos picos cromatográficos que aparecen en otras fracciones, como se puede apreciar en las figuras 18, 19 y 20. Por otro lado se detectó la presencia de picos en algunas fracciones que no corresponden estrictamente con el volumen de elución de los picos obtenidos durante las corridas de fraccionamiento; Como fue el caso de la fracción 2 y en cuyo perfil cromatográfico además de encontrarse presente el pico de la fracción 1, se encontró un pico intermedio cuyo volumen de elución es de 11.0 mL, y el cual no coincidió con el volumen de elución de ninguno de los 6 picos obtenidos en el fraccionamiento. Esto posiblemente derive de un fenómeno de partición de picos, el cual resulta más evidente al reducir la escala de los cromatogramas obtenidos en el análisis individual de las fracciones.

Por último y con respecto a las fracciones 3 y 6, se observó que se encuentran conformadas mayoritariamente por picos que corresponden a otras fracciones, mientras que los picos característicos de estas fracciones se aprecian en muy baja proporción (menor al 16%), lo que es indicio de su baja pureza y a la vez ocasiona una mayor variación en los parámetros cromatográficos entre lotes.

En las figuras 18, 19 y 20 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos del análisis de cada una de las fracciones de manera individual por FPLC. Así como una tabla comparativa en la que se muestran los parámetros cromatográficos de cada una de las fracciones en los 3 lotes (tabla 7).

a) Lote 14D12-A:

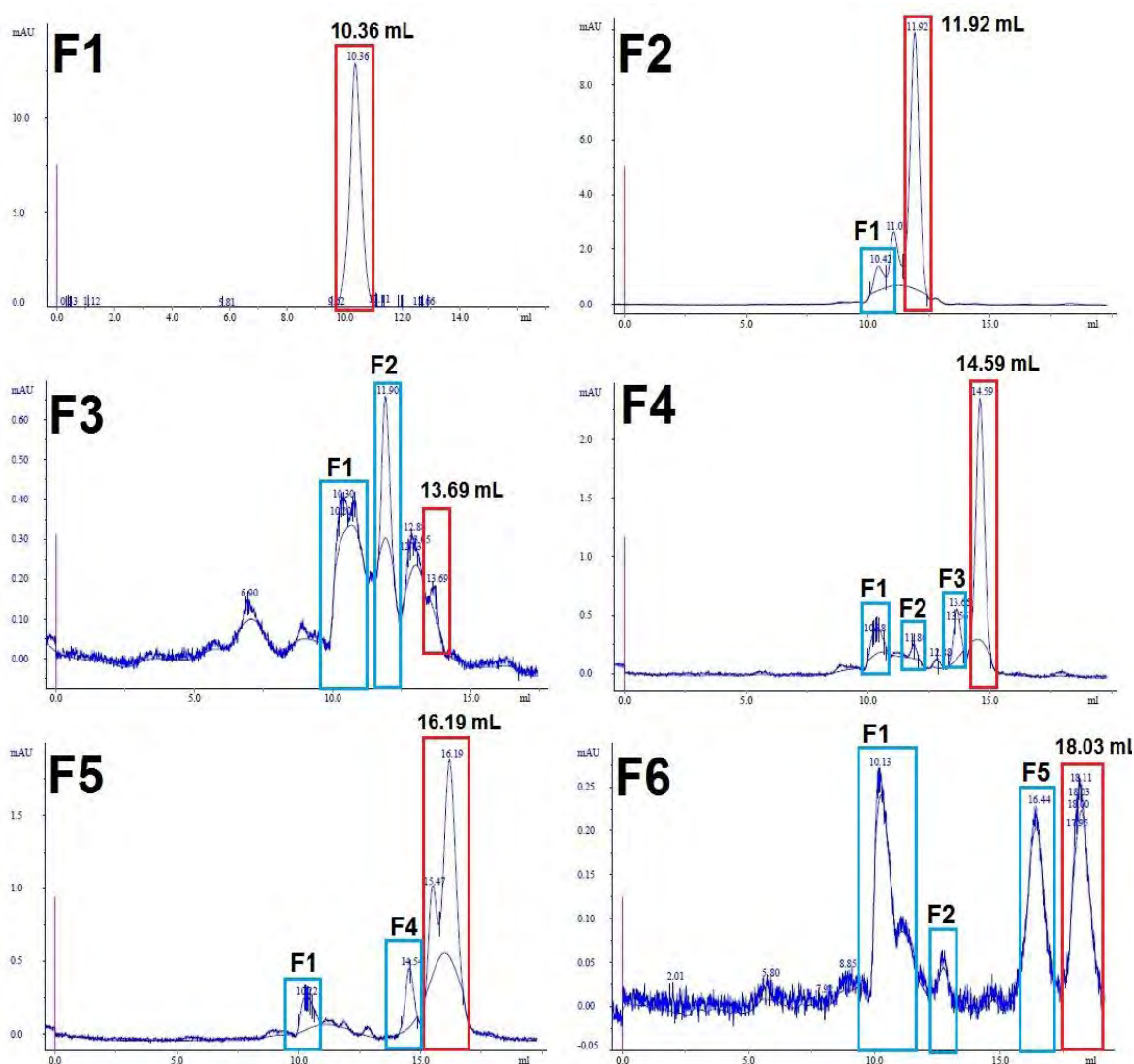


Figura 18: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 14D12-A mediante SE-FPLC.

Buffer de corrida: Fosfato de sodio monobásico/dibásico 51.7 mM, cloruro de sodio 103.7 mM., pH 7.0. Volumen de muestra inyectado: 50 μ L. Flujo: 0.6 mL/min. Columna Ultrahydrogel 500.

Nota: El pico dentro del recuadro rojo corresponde al característico de fracción en cuestión, mientras que los picos en recuadros azules señalan los picos co-eluyentes correspondientes a otras fracciones (marcadas como F1-F6) y los cuales fueron identificados a partir de su volumen de elución.

b) Lote 13C09:

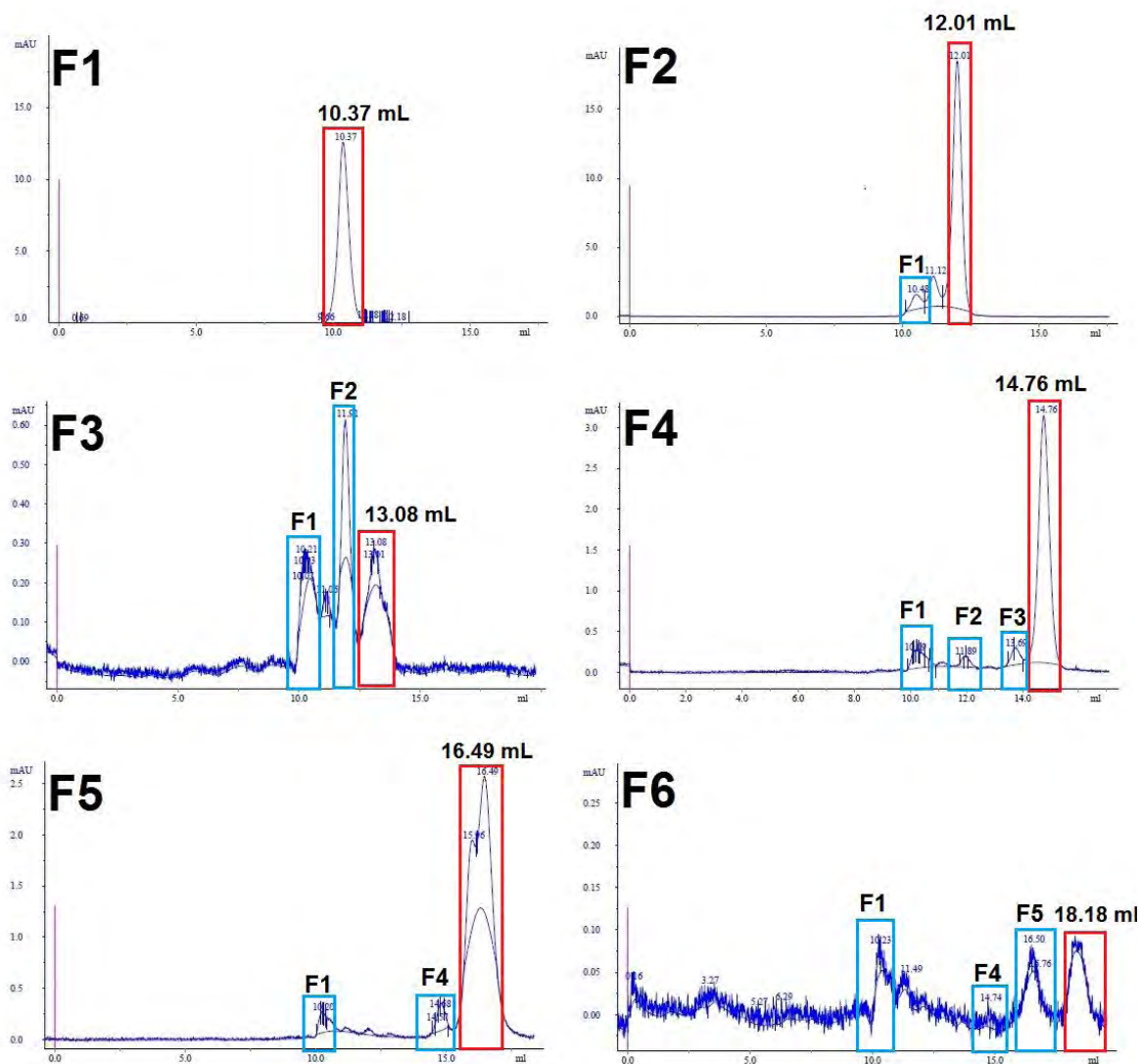


Figura 19: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13C09 mediante SE-FPLC.

Buffer de corrida: Fosfato de sodio monobásico/dibásico 51.7 mM, cloruro de sodio 103.7 mM., pH 7.0. Volumen de muestra inyectado: 50 μ L. Flujo: 0.6 mL/min. Columna Ultrahydrogel 500. Nota: El pico dentro del recuadro rojo corresponde al característico de fracción en cuestión, mientras que los picos en recuadros azules señalan los picos co-eluyentes correspondientes a otras fracciones (marcadas como F1-F6) y los cuales fueron identificados a partir de su volumen de elución.

c) Lote 13E16:

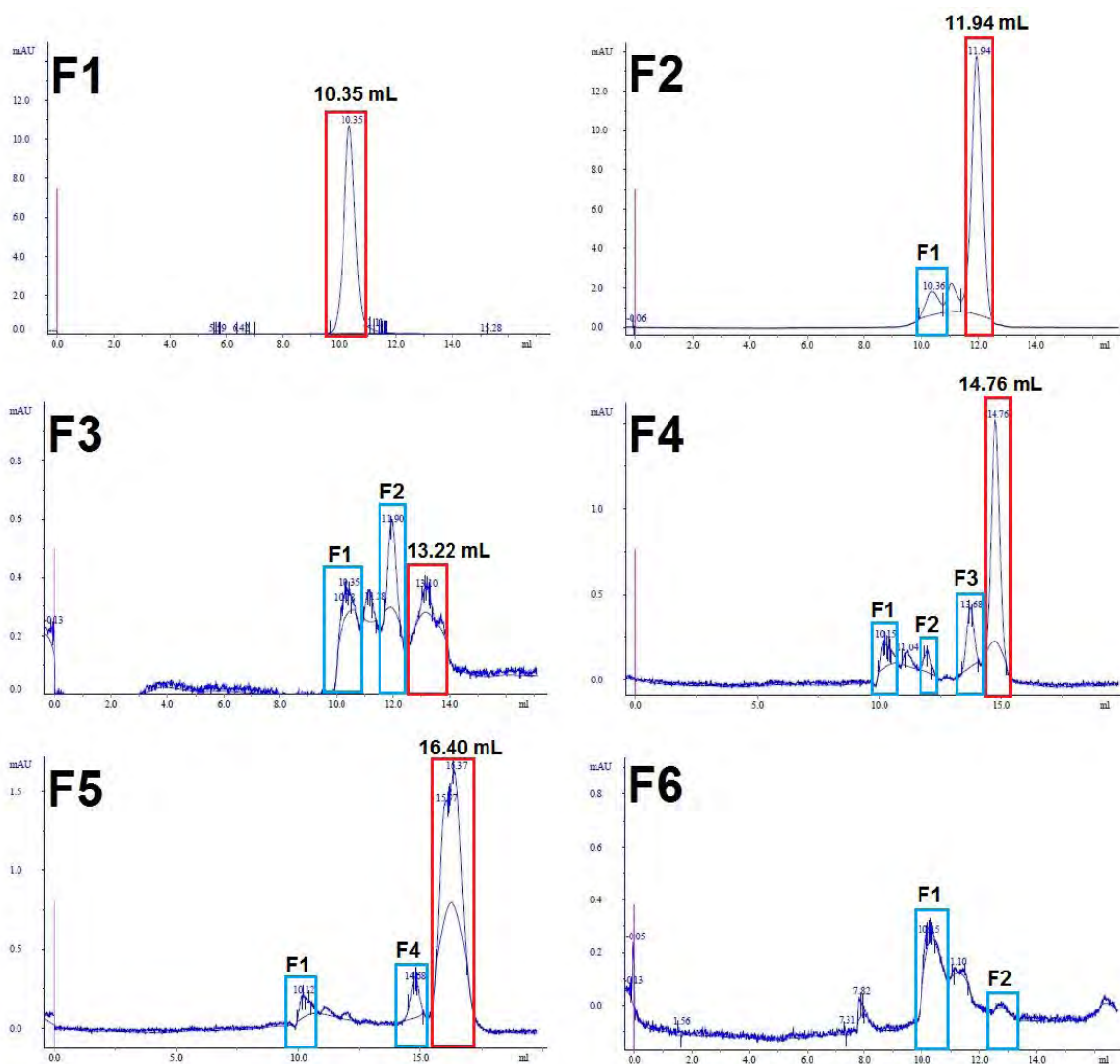


Figura 20: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13E16 mediante SE-FPLC.

Buffer de corrida: Fosfato de sodio monobásico/dibásico 51.7 mM, cloruro de sodio 103.7 mM., pH 7.0. Volumen de muestra inyectado: 50 μ L. Flujo: 0.6 mL/min. Columna Ultrahydrogel 500.

Nota: El pico dentro del recuadro rojo corresponde al característico de fracción en cuestión, mientras que los picos en recuadros azules señalan los picos co-eluyentes correspondientes a otras fracciones (marcadas como F1-F6) y los cuales fueron identificados a partir de su volumen de elución.

Tabla 7: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones por SE-FPLC.

Fracción	14D12-A		13C09		13E16	
	Vol. elución (mL)	% Pureza	Vol. elución (mL)	% Pureza	Vol. elución (mL)	% Pureza
F1	10.36	99.06	10.37	98.94	10.35	98.70
F2	11.92	77.76	12.01	84.60	11.94	82.53
F3	13.69	4.88	13.08	15.15	13.22	13.11
F4	14.89	74.86	14.76	87.09	14.76	72.35
F5	16.19	77.43	16.49	85.89	16.40	84.04
F6	18.03	51.83	18.18	5.67	ND	NA

Notas:

- 1) La pureza se calculó en función del área de cada uno de los picos, mientras que la identificación de las fracciones se realizó mediante volumen de elución obtenido de cada una durante las corridas de fraccionamiento.
- 2) ND: No se detectó el pico en el análisis, NA: No aplica.

6.3.2 Determinación de identidad y pureza por SE-UPLC:

El análisis de las fracciones obtenidas, así como de los estándares de Transferón® y de peso molecular, por UPLC cuya sensibilidad y resolución es considerablemente mayor con respecto a FPLC, permitió apreciar detalles que no se percibieron anteriormente en el análisis realizado por FPLC; como por ejemplo, el perfil cromatográfico correspondiente al estándar interno de Transferón® y el cuál se encuentra conformado por 8 picos (Figura 21-A), donde el pico 5 es el que se encuentra en mayor proporción, mientras que el pico 7 es el que se encuentra en menor proporción (tabla 9). Dado que el tiempo de retención de los 8 picos resultó ser mayor que el tiempo de retención obtenido con la mioglobina (incluida en el marcador de peso molecular, ver tabla 8) y cuyo peso es de 17 kDa, se pudo determinar que el peso molecular de las especies comprendidas en Transferón® es menor a 17 kDa, tal y como lo refiere la bibliografía (1).

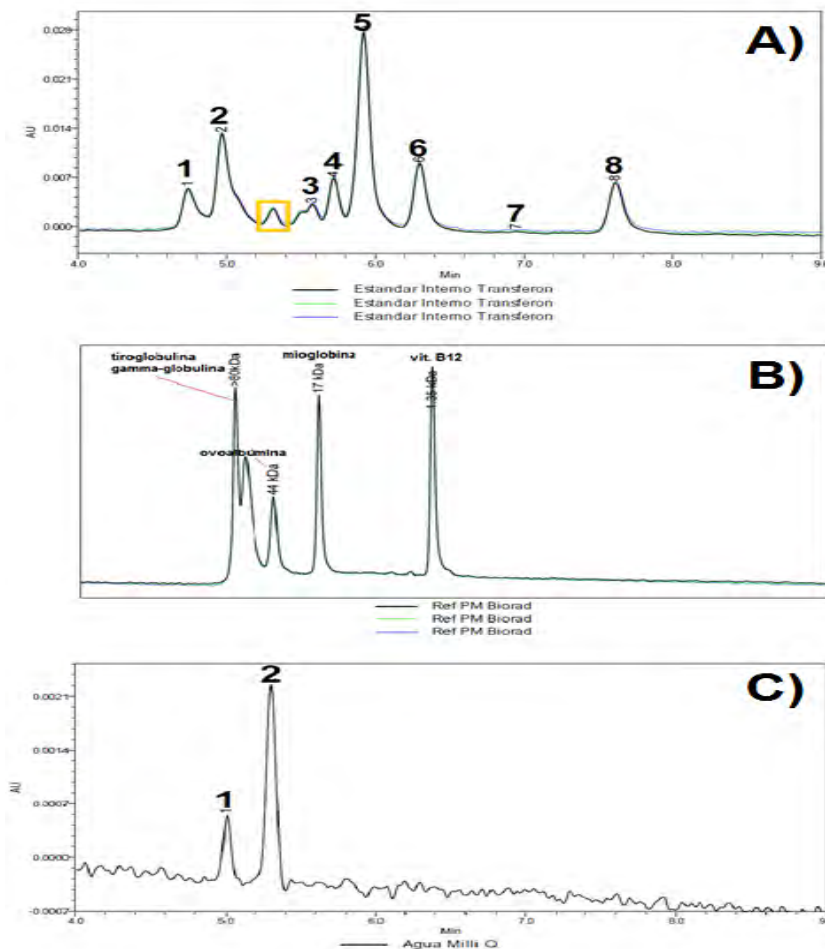


Figura 21: Perfiles cromatográficos del estándar interno de Transferón® (A), del estándar comercial de peso molecular (B) y del disolvente (agua) (C), obtenidos mediante SE-UPLC. Fase móvil: Buffer fosfato de sodio monobásico/dibásico 50 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6.81. Flujo: 0.4 mL/min. Columna BEH 125.

Nota: El recuadro amarillo en el perfil A indica la señal generada por el blanco, (grafico C) de modo tal que este pico no se toma en cuenta como parte del perfil cromatográfico de Transferón® y por tanto tampoco se toma en cuenta para el cálculo del porcentaje de área en cada pico. Los números permiten la identificación de cada uno de los picos tanto en el estándar interno de Transferón® como en las fracciones.

Tabla 8: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del estándar comercial de peso molecular (*Biorad Gel Filtration Standard*®) mediante SE-UPLC.

No. Pico	Molécula	Peso molecular	Tiempo retención promedio (min)	% Área promedio
1	Tiroglobulina, gamma globulina	Mayor a 80	2.5	21.6
2	Ovoalbúmina	44	3.1	12.2
3	Mioglobina	17	3.8	17.7
4	Vitamina B12	1.35	5.7	22.9

Tabla 9: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del estándar interno de Transferón® mediante SE-UPLC.

No. Pico	Tiempo de retención promedio (min)	% Área promedio
1	4.7	8.0
2	5.0	20.3
3	5.6	6.5
4	5.7	7.7
5	5.9	34.3
6	6.3	12.3
7	7.0	0.4
8	7.6	10.3

Por otra parte, el blanco de análisis (Agua) presento una ligera señal, la cual tiene un tiempo de retención característico (alrededor de 5 minutos, ver gráfico 21-C y tabla 10), por lo que a partir de este dato es posible descartar algún componente que dicha señal se encuentre asociada a un componente de Transferón® o de las fracciones analizadas. Para efectos ilustrativos se marca en un recuadro amarillo a dicha señal generada por el disolvente dentro de los cromatogramas presentados.

Tabla 10: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis del blanco (agua tipo 1) mediante SE-UPLC.

Pico	Tiempo de retención (min)
1	5.0
2	5.3

Con respecto a los resultados obtenidos en el análisis individual de las fracciones obtenidas de los diferentes lotes de Transferón® (Figuras 22, 23 y 24), se pudo establecer que algunas de éstas, principalmente las que presentaron mayor pureza en el análisis de identidad realizado por FPLC, en realidad se encuentran conformadas por más de un solo pico; Tal es el caso de la fracción 1 que se

encuentra conformada por los picos 1 y 2 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC y el de la fracción 2, conformada por los picos 3, 4 y 5 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC (ver identificación de picos en figura 21-A). Esto era de esperarse dado que existieron indicios de ello en el análisis de identidad y pureza por FPLC. Mientras que la fracción 4, conformada mayoritariamente por el pico 6 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC y la fracción 5, conformada mayoritariamente por el pico 8 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC; presentaron picos co-eluyentes característicos de otras fracciones, lo cual también coincide con lo observado en el análisis de identidad y pureza de las fracciones por FPLC. La presencia de picos co-eluyentes en estas fracciones podría deberse a la disminución de la capacidad de resolución de la columna empleada para realizar el fraccionamiento en el intervalo de peso molecular en el que se encuentran dichas fracciones (menor a 1.35 kDa, según los resultados obtenidos en el análisis del estándar de peso molecular) por lo que estas fracciones se encuentran en el límite del intervalo de peso molecular óptimo de separación de la columna (1 - 400 kDa). Por último y con respecto a la fracción 3, ésta se encuentra conformada básicamente por el pico 5 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC (el cual es mayoritario y característico de la fracción 2), aunque con muy poca intensidad de la señal. Por último, la fracción 6 contiene a los picos 7 y 8 del perfil de Transferón® obtenido por UPLC únicamente en el caso del lote 14D12, por lo que en los lotes restantes no se detectó ninguna señal diferente a la línea base (tablas 11, 12 y 13, página 55-56).

Lote 14D12-A:

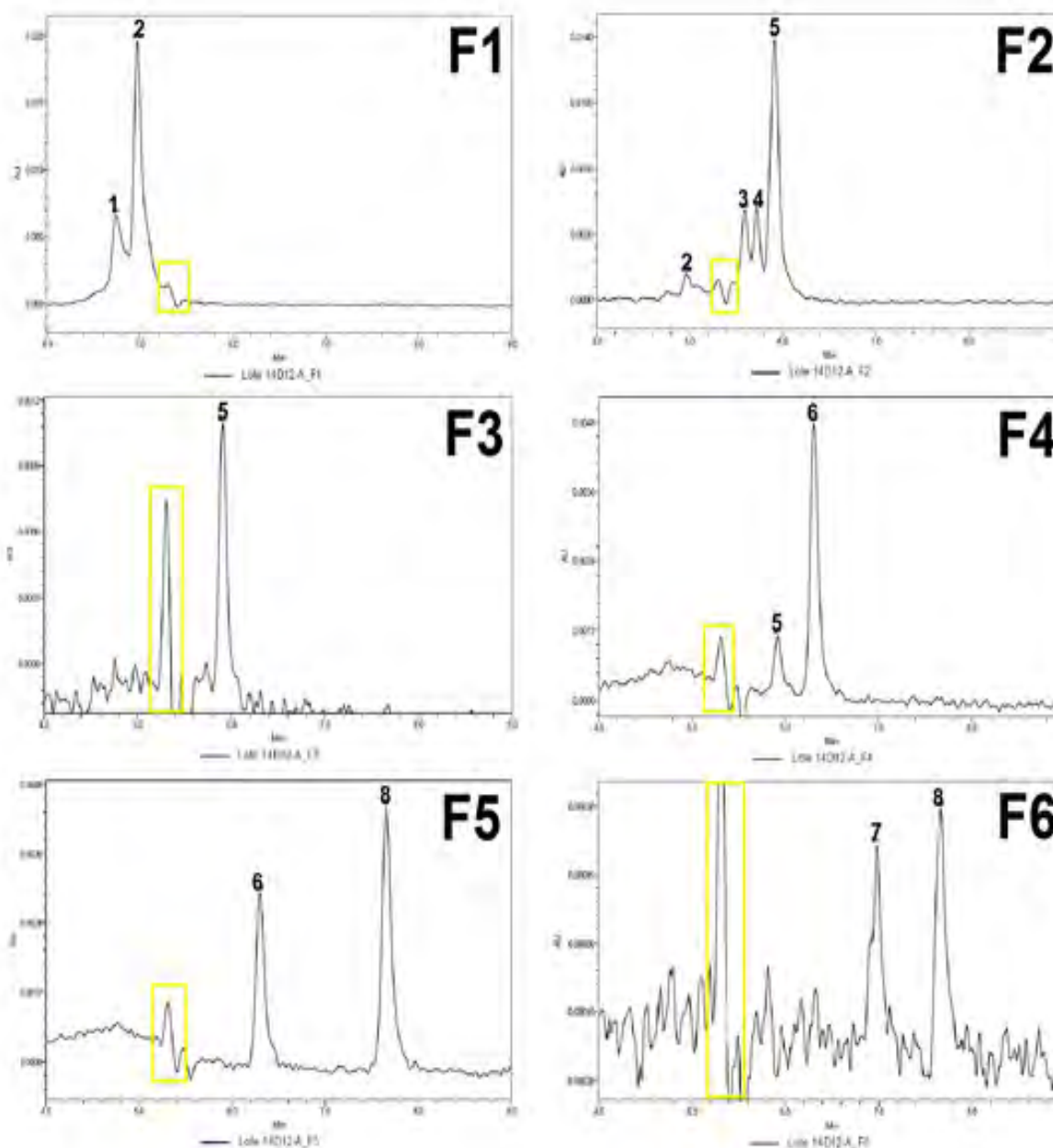


Figura 22: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 14D12-A mediante SE-UPLC.

Fase móvil: Buffer fosfato de sodio monobásico/dibásico 50 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6.81. Flujo: 0.4 mL/min. Columna BEH 125.

Nota: El recuadro amarillo indica la señal generada por el blanco, de modo tal que este pico no se toma en cuenta como parte del perfil cromatográfico de Transferón® y por tanto tampoco se toma en cuenta para el cálculo del porcentaje de área en cada pico. Los números permiten la identificación de cada uno de los picos tanto en el estándar interno de Transferón® como en las fracciones.

Lote 13C09:

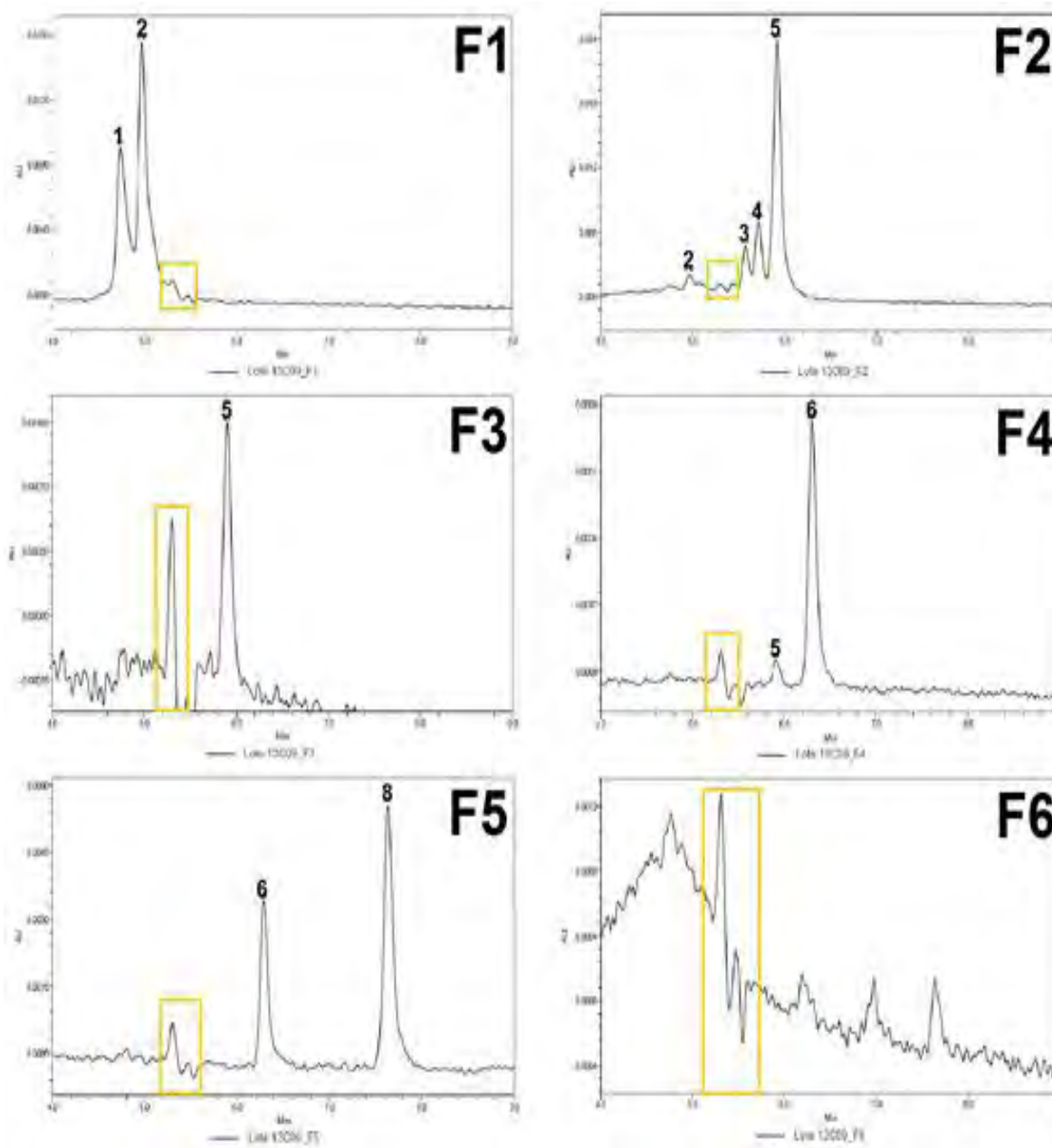


Figura 23: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13C09 mediante SE-UPLC.

Fase móvil: Buffer fosfato de sodio monobásico/dibásico 50 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6.81. Flujo: 0.4 mL/min. Columna BEH 125.

Nota: El recuadro amarillo indica la señal generada por el blanco, de modo tal que este pico no se toma en cuenta como parte del perfil cromatográfico de Transferón® y por tanto tampoco se toma en cuenta para el cálculo del porcentaje de área en cada pico. Los números permiten la identificación de cada uno de los picos tanto en el estándar interno de Transferón® como en las fracciones

Lote 13E16:

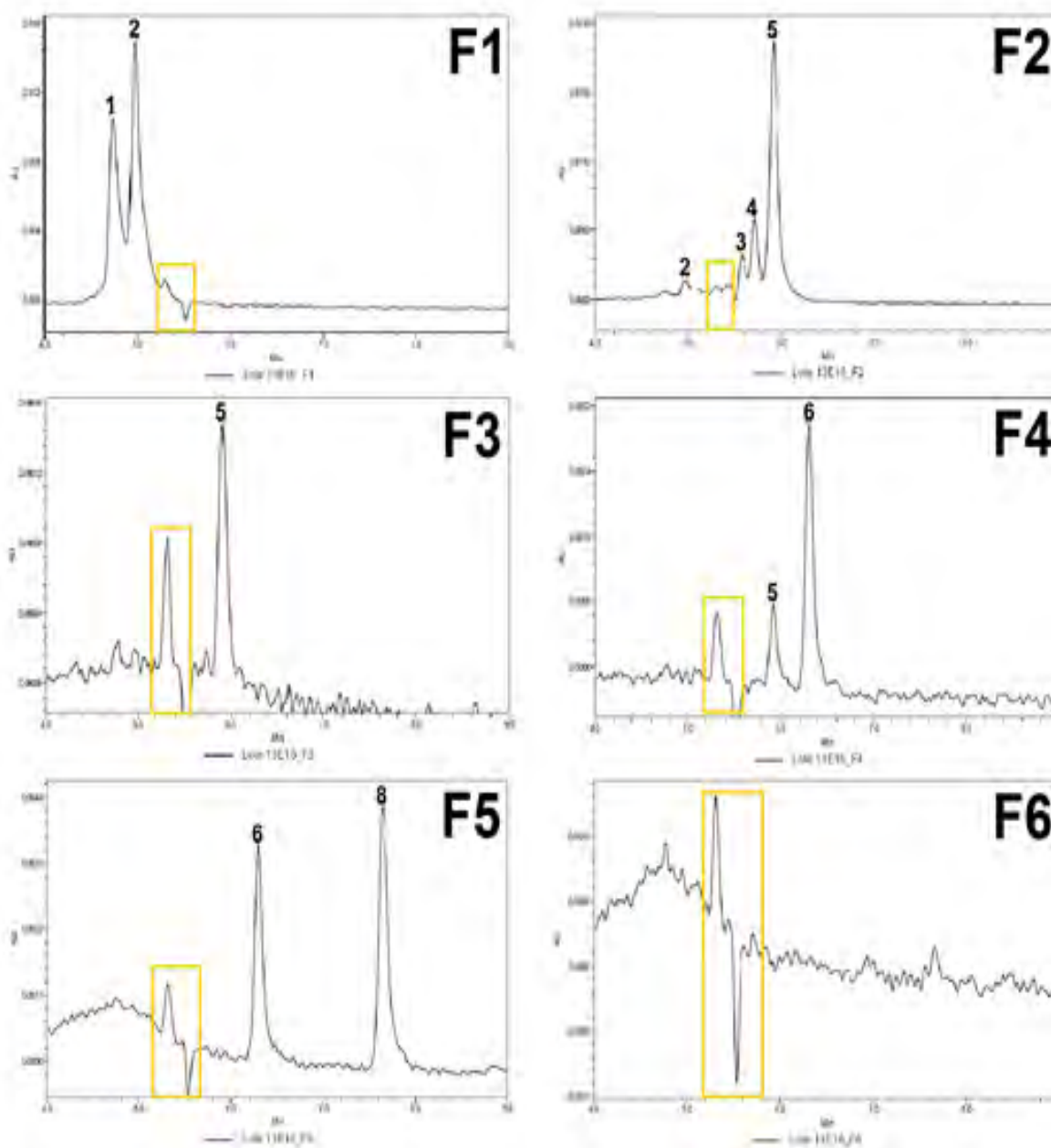


Figura 24: Análisis individual de las fracciones obtenidas del lote 13E16 mediante SE-UPLC.

Fase móvil: Buffer fosfato de sodio monobásico/dibásico 50 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6.81. Flujo: 0.4 mL/min. Columna BEH 125.

Nota: El recuadro amarillo indica la señal generada por el blanco, de modo tal que este pico no se toma en cuenta como parte del perfil cromatográfico de Transferón® y por tanto tampoco se toma en cuenta para el cálculo del porcentaje de área en cada pic. Los números permiten la identificación de cada uno de los picos tanto en el estándar interno de Transferón® como en las fracciones.

Tabla 11: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 14D12-A mediante SE-UPLC.

Fracción (FPLC)	No. Pico (Correspondiente al perfil de Transferón® obtenido por UPLC)	Volumen de elución (mL)	% Área
F1	1	4.7	30.0
	2	5.0	69.6
F2	2	5.0	7.3
	3	5.6	16.4
	4	5.7	16.3
	5	5.9	60.0
F3	5	5.9	100
F4	5	5.9	10.6
	6	6.3	89.4
F5	6	6.3	36.4
	8	7.7	63.6
F6	7	7.0	47.1
	8	7.8	52.9

Tabla 12: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 13C09 mediante SE-UPLC.

Fracción (FPLC)	No. Pico (Correspondiente al perfil de Transferón® obtenido por UPLC)	Volumen de elución (mL)	% Área
F1	1	4.7	38.6
	2	5.0	61.4
F2	2	5.0	4.6
	3	5.6	11.2
	4	5.7	17.2
	5	5.9	67.0
F3	5	5.9	100.0
F4	5	5.9	8.5
	6	6.3	91.5
F5	6	6.3	34.8
	8	7.6	65.2
F6	SD	NA	NA

Tabla 13: Parámetros cromatográficos obtenidos del análisis individual de las fracciones del lote 13E16 mediante SE-UPLC.

Fracción (FPLC)	No. Pico (identificado en base al perfil de Transferón® obtenido por UPLC)	Volumen de elución (mL)	% Área
F1	1	4.7	42.2
	2	5.0	57.8
F2	2	5.0	4.4
	3	5.6	9.3
	4	5.7	18.0
	5	5.9	68.3
F3	5	5.9	100.0
F4	5	5.9	18.4
	6	6.3	81.6
F5	6	6.3	41.0
	8	7.6	59.0
F6	SD	NA	NA

Nota:

SD (Sin detección): No se detecta ninguna señal mayor a la de la línea base en el cromatograma.

NA: No aplica

6.3.3 Determinación del contenido peptídico:

El análisis del contenido peptídico en cada una de las fracciones obtenidas de 3 diferentes lotes de Transferón®, tanto por el método colorimétrico del ácido bicinconínico como por medición de absorbancia a 280 nm, indicó que la mayor parte del contenido peptídico reside en las primeras dos fracciones (F1 y F2). La fracción 1 presentó una mayor concentración peptídica por el método de BCA, mientras que la fracción 2 presentó mayor contenido peptídico por medición de absorbancia a 280 nm. Por otro lado, las fracciones de menor peso molecular (F3-F6) también presentaron marcadas diferencias en el contenido peptídico determinado por ambos métodos; pues mientras la fracción 3 presentó una estimación más alta por BCA, las fracciones 4, 5 y 6 presentaron una mayor estimación por medición de absorbancia a 280 nm (Tablas 14 y 15, figuras 25 y 26).

Tabla 14: Contenido peptídico (en µg/mL) por el método de BCA para las fracciones obtenidas de Transferón®.

Fracción	14D12-A µg/mL	13C09 µg/mL	13E16 µg/mL	Promedio µg/mL	DE	% CV
F1	290.14	290.49	248.25	276.29	19.83	7.18
F2	136.56	183.75	174.00	164.67	20.34	12.34
F3	22.07	21.66	30.66	24.80	4.15	16.73
F4	17.69	12.56	20.92	17.06	3.44	20.18
F5	21.31	20.95	22.02	21.43	0.44	2.07
F6	10.13	12.24	17.62	13.33	3.15	23.66

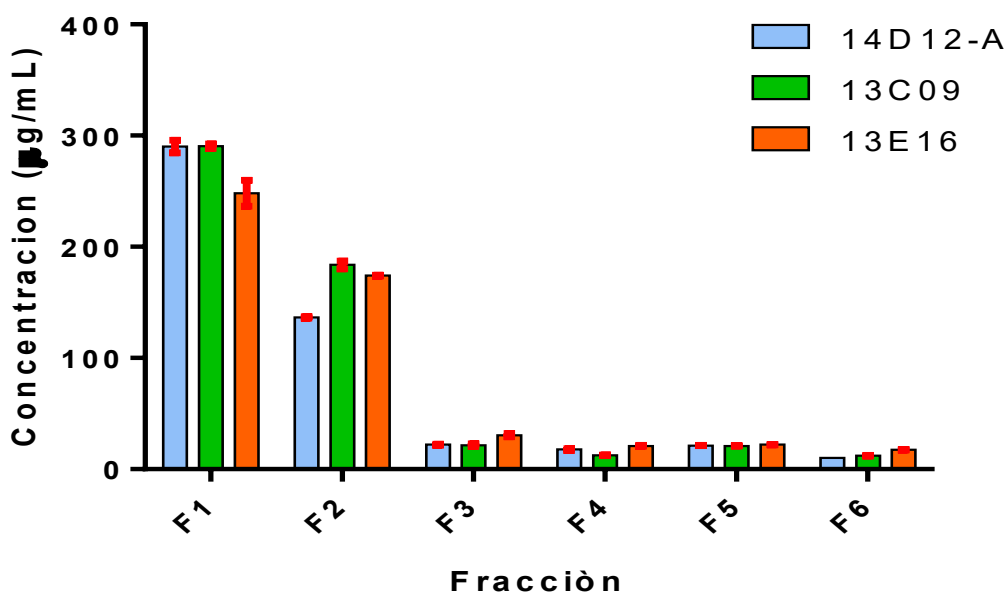


Figura 25: Concentración de péptidos totales (expresada en µg/mL) obtenida de las fracciones de 3 lotes de Transferón® por el método de BCA.

Nota: Las barras en rojo en la parte superior de cada barra expresan el coeficiente de variación en porcentaje de cada determinación.

Tabla 15: Contenido peptídico (en µg/mL) por medición de absorbancia a 280 nm para las fracciones obtenidas de Transferón®.

Fracción	14D12-A µg/mL	13C09 µg/mL	13E16 µg/mL	Promedio µg/mL	DE	% CV
F1	251	233	196.5	226.83	22.67	10.00
F2	203	390	336	309.67	78.58	25.38
F3	55.5	39.5	46	47.00	6.57	13.98
F4	101	102	70	91.00	14.85	16.32
F5	130.5	137.5	104.5	124.17	14.20	11.43
F6	68.5	42	20	43.50	19.83	45.58

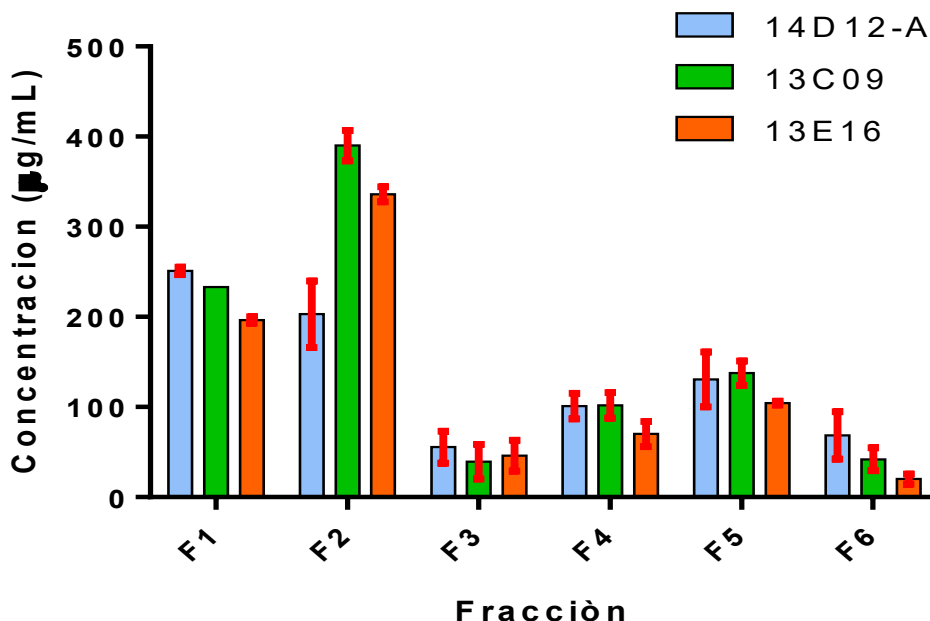


Figura 26: Concentración de péptidos totales (expresada en $\mu\text{g/mL}$) obtenida de las fracciones de 3 lotes de Transferón® por medición de absorbancia a 280 nm.
 Nota: Las barras en rojo en la parte superior de cada barra expresan el coeficiente de variación en porcentaje de cada determinación.

Para entender las diferencias en el contenido peptídico de las fracciones, obtenido por ambas metodologías, es fundamental mencionar que estas tienen principios así como limitaciones diferentes. Es por ello que los resultados en cada técnica están influenciados, además de la concentración de péptidos, por la naturaleza de estos (aminoácidos que los conforman), así como la presencia de otras moléculas que también pudieran interferir en la determinación. En este sentido, la medición de absorbancia a 280 nm está basada principalmente en la excitación de moléculas con carácter aromático y dobles enlaces, por lo que péptidos compuestos abundantemente por aminoácidos con tal carácter (triptófano, fenilalanina y tirosina) presentarán una absorción mayor. Lo anterior indica que otras moléculas de naturaleza aromática de carácter no peptídico también contribuirán a la intensidad de la absorción. Por otra parte, el método colorimétrico de BCA tiene su fundamento en la reacción de reducción del ion Cu^{2+} causada por el enlace peptídico de las proteínas para dar origen a una reacción secundaria con el ácido bicinconínico, formando un complejo colorido cuantificable a 562 nm, por lo que este método se

vuelve más específico para obtener lecturas proporcionales a la concentración peptídica de la muestra.

A partir de lo anterior y con los resultados obtenidos del análisis de las fracciones, se puede concluir que fracciones con una mayor estimación por medición de absorbancia a 280 nm (como fue el caso de las fracciones 4, 5 y 6) presentan una mayor proporción de aminoácidos u otras moléculas de carácter aromático (fenilalanina, tirosina y triptófano). Mientras que fracciones con una alta estimación por el método de BCA (principalmente F1 y F2), presentan mayor contenido de péptidos. Adicionalmente, en esta diferencia pudiese radicar en que para la estimación de concentración por UV se considera un coeficiente de absorptividad ideal de 1 ($\text{mg de proteína} \times \text{ml}^{-1}$). Los resultados obtenidos en la determinación del contenido peptídico de las fracciones concuerdan totalmente con el comportamiento cromatográfico observado, pues F1 y F2 son las fracciones que eluyen primero, es decir, las de mayor peso molecular. Por lo que es más probable que en estas fracciones se encuentre un mayor número de enlaces peptídicos (péptidos más grandes), mientras que las fracciones de menor peso molecular (F3 - F6) posiblemente estén constituidas por péptidos muy pequeños, aminoácidos libres u otras moléculas. Un caso excepcional ocurre con F2, donde se obtuvieron lecturas altas por ambos métodos como se mencionó antes, por lo que es posible que existan péptidos con abundancia en aminoácidos de carácter aromático en tal fracción.

6.3.4 Prueba confirmatoria de esterilidad:

Ninguna de las fracciones obtenidas presentó señales de crecimiento microbiano tras ser esterilizadas por filtración y posteriormente sembradas e incubadas en caldo nutritivo durante 72 horas a 37°C.

El control de crecimiento microbiano por el contrario, presentó señales de desarrollo microbiano desde las 24 horas de incubación, mientras que el control negativo y que consistió en una alícuota de caldo nutritivo manipulada de igual forma que las muestras, no presentó alguna señal de crecimiento. Esto demuestra la funcionalidad

del sistema empleado y garantiza la validez de los resultados obtenidos con las fracciones.

6.3.5 Determinación de contenido de endotoxina bacteriana:

La curva patrón de endotoxina presentó formación de gel hasta el estándar correspondiente a 0.125 UE/mL, por lo que se consideró dicho valor como el límite de detección de la metodología.

En el análisis realizado a las fracciones no se obtuvo formación apreciable de gel en ninguna de ellas, tanto de manera directa como en las diluciones seriadas realizadas, de tal forma que la cantidad de endotoxina presente por mL de cada fracción se considera inferior a 0.125 UE/mL.

6.3.6 Ensayo biológico para la estimulación de la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat:

El ensayo biológico realizado con las fracciones obtenidas de 2 lotes de Transferón® (14D12-A y 13C09) mostró una producción de IFN- γ tras la estimulación con la fracción 4 en ambos lotes, mientras que las fracciones 2 y 6 lograron una producción de esta citocina únicamente en el lote 14D12-A y la fracción 5 únicamente en el lote 13C09. Por el contrario, las fracciones 1 y 3 no indujeron producción de IFN- γ tras la estimulación en ninguno de los dos lotes evaluados. Las muestras de Transferón® sin fraccionar indujeron producción de IFN- γ (con una media de 9.6 pg IFN- γ /mL para el lote 14D12-A y 5.8 pg IFN- γ /mL para el lote 13C09), lo que demuestra que tales lotes presentan actividad biológica (Figuras 27 y 28). Por otra parte, el control positivo de estimulación (Concanavalina A) indujo producción considerable de IFN- γ (con una media de 16 pg/mL), lo que demuestra la capacidad del sistema biológico utilizado para responder a la estimulación bajo las condiciones de ensayo, mientras que el control basal de estimulación y que corresponde únicamente a la suspensión celular con el medio utilizado (sin adición de algún estímulo), no mostró producción significativa de IFN- γ . Con respecto al

control de fase móvil, se puede observar que indujo producción de IFN- γ superior al límite de detección del método (con una media de 5.7 pg/mL) (Figura 29).

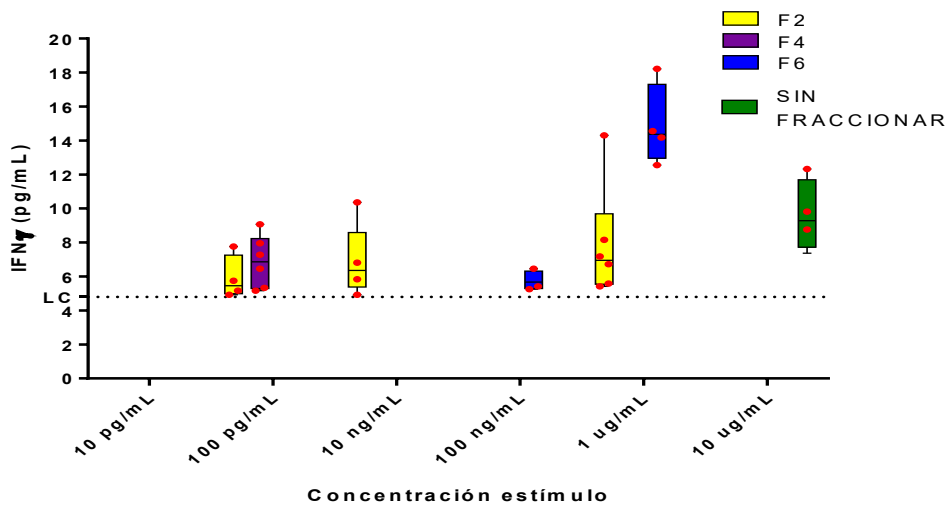


Figura 27: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con las fracciones del lote 14D12-A.

Notas:

- 1) 6 datos obtenidos por cada estímulo (3 réplicas en el ensayo de cultivo celular, cada réplica analizada por duplicado en ELISA)
- 2) Únicamente se graficaron los estímulos cuya producción de IFN- γ estuviese por arriba del límite de cuantificación (LC) del método en al menos 4 de las 6 datos obtenidos (puntos rojos).

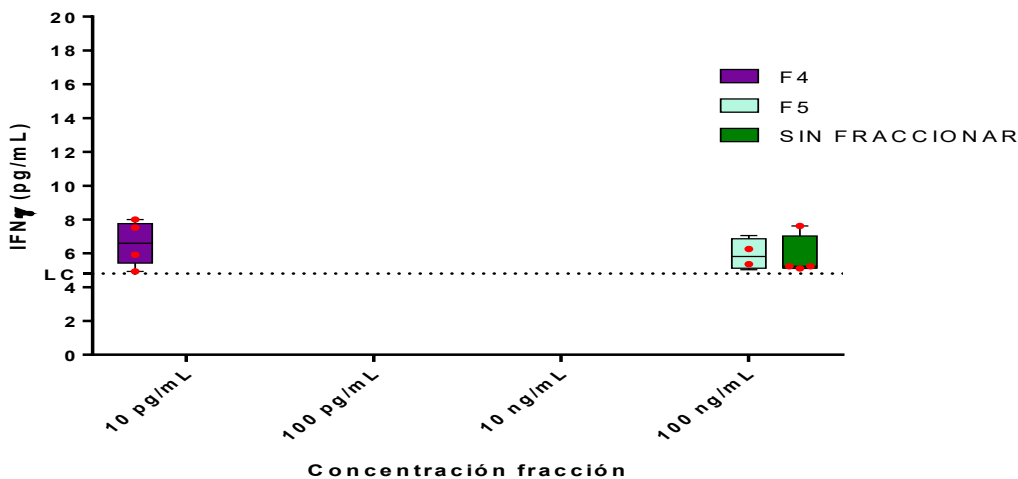


Figura 28: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con las fracciones del lote 13C09.

Notas:

- 1) 6 datos obtenidos por cada estímulo (3 réplicas en el ensayo de cultivo celular, cada réplica analizada por duplicado en ELISA)
- 2) Únicamente se graficaron los estímulos cuya producción de IFN- γ estuviese por arriba del límite de cuantificación (LC) del método en al menos 4 de las 6 datos obtenidos (puntos rojos).

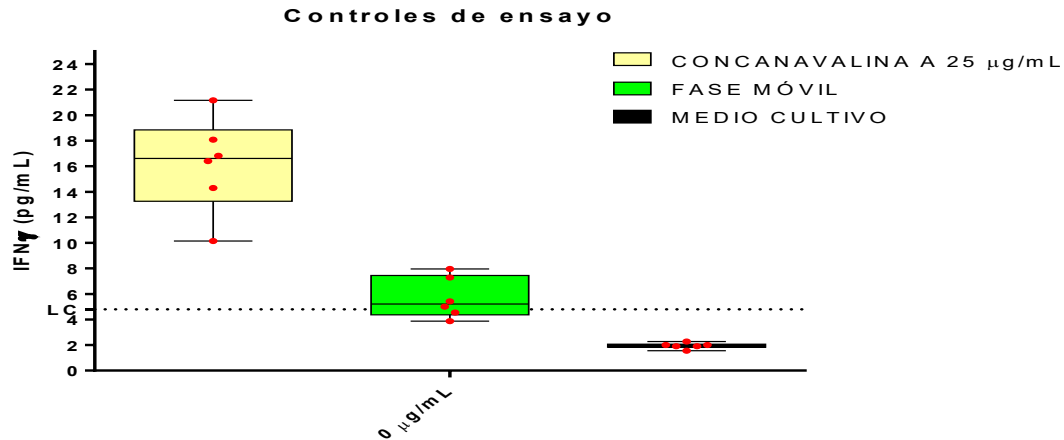


Figura 29: Gráfico tipo caja y bigote que representa la producción de IFN- γ en cultivo de células Jurkat estimulado con los controles de ensayo (Concanavalina A, Fase móvil y Medio de cultivo)

Notas:

- 1) 6 datos obtenidos por cada estímulo (3 réplicas en el ensayo de cultivo celular, cada réplica analizada por duplicado en ELISA)
- 2) Únicamente se graficaron los estímulos cuya producción de IFN- γ estuviese por arriba del límite de cuantificación (LC) del método en al menos 4 de las 6 datos obtenidos (puntos rojos).

Como se puede observar, la producción de IFN- γ tanto con las fracciones como con los lotes sin fraccionar no es dependiente con la concentración peptídica empleada como referencia para estimular las células, sino que se observó producción solo con concentraciones puntuales, obteniendo respuesta nula a concentraciones superiores o inferiores. Esto podría ser debido a la presencia de diferentes especies moleculares que tienen la capacidad de inducir producción de IFN- γ en las células empleadas, sin embargo y con las técnicas analíticas utilizadas en el análisis de las fracciones resulta imposible detectar la presencia y concentración específica de cada una de estas moléculas, lo que impide relacionar de manera proporcional el efecto concentración – respuesta en las fracciones obtenidas. De igual forma es posible que moléculas diferentes con la capacidad de inducir esta actividad biológica actúen a través de vías diferentes en la célula, por lo que la concentración mínima requerida de la molécula para superar el umbral de activación en cada vía sea distinta.

Lo anterior también se refleja en la magnitud de la respuesta obtenida en las fracciones que mostraron algún grado de actividad biológica, con respecto a los

lotes sin fraccionar. Pues las fracciones tienden a tener una mayor producción de IFN- γ con respecto a los lotes sin fraccionar. Este fenómeno pudiera tener relación con el hecho de que en ciertas fracciones la proporción de la o las moléculas que sean causantes de la producción de IFN- γ es mayor en comparación al lote completo sin fraccionar, es decir, en el proceso de fraccionamiento se enriquecieron algunas de estas fracciones, lo que lleva a un aumento en la probabilidad de que dichas moléculas interaccionen con las células y por tanto se produzca con mayor intensidad la respuesta biológica.

Con respecto a la producción de IFN- γ observada con el control de fase móvil, en la bibliografía (58, 59) se ha reportado que la presencia de sales en el medio ejerce influencia en los patrones de secreción de citocinas en leucocitos a través de cambios en la estructura del citoesqueleto y las vías de señalización que intervienen en la producción de citocinas pro-inflamatorias, además de inducir cambios en la liberación de enzimas líticas y en la liberación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo se tiene descrito también que tales eventos están relacionados proporcionalmente a la concentración de sales en el medio (59), por lo que en los resultados obtenidos y, como ya se mencionó con anterioridad, la producción de IFN- γ en las fracciones y en los lotes sin fraccionar no presenta un comportamiento dependiente de la concentración del estímulo (concentración de las fracciones). De tal forma que el efecto biológico de las fracciones no se apreció en las concentraciones más altas, que es en donde se encuentra también la mayor cantidad de sales provenientes de la fase móvil sino que se presentó en las diluciones subsecuentes, donde la concentración de la fase móvil prácticamente sería despreciable (por ejemplo, en la dilución correspondiente a 100 ng/mL, se esperaría tener a lo mucho una proporción de una parte de fase móvil por cada 100 partes de medio de cultivo y contemplando la dilución que se realiza al adicionar la suspensión celular y el estímulo por cada pozo, se tiene un factor de dilución de 1:200), por lo que la producción de IFN- γ observada en las fracciones que presentan actividad biológica no podría ser entonces atribuida al efecto que pudieran tener las sales de la fase móvil.

Por último y en base a los resultados obtenidos en este modelo biológico, no existe una tendencia proporcional entre el peso molecular de las fracciones y la actividad biológica de estas. Pues a excepción de la fracción 2, la cual solo presenta actividad en uno de los lotes evaluados, la actividad biológica reside en las fracciones de menor peso molecular, principalmente en la fracción 4, cuya actividad es consistente en ambos lotes y además en concentraciones similares de estímulo (10 pg/mL para el lote 13C09 y 100 pg/mL para el lote 14D12-A). Por lo que es importante tener en cuenta estos resultados como punto de partida para investigaciones posteriores con respecto a la composición y caracterización de Transferón®.

7 DISCUSIÓN:

Como ya se había mencionado, Transferón® es un bioterapéutico utilizado en padecimientos con componente inflamatorio, cuyo proceso de producción se realiza bajo las buenas prácticas de fabricación y por tanto permite la obtención de un producto que presenta consistencia en los parámetros de calidad entre diferentes lotes (1). Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en el fraccionamiento por FPLC y la caracterización de las fracciones obtenidas de 3 lotes de Transferón® distintos, en donde se obtuvo un comportamiento cromatográfico muy similar entre ellos. Este comportamiento está denotado por un perfil cromatográfico compuesto de 6 picos o fracciones. Dichas fracciones se colectaron y se analizaron mediante SE-FPLC y SE-UPLC encontrando en las fracciones 1, 2, 4 y 5 un pico mayoritario y característico de cada una, como bien se refleja en los cromatogramas obtenidos así como en los parámetros cromatográficos que resultan de dichos análisis. Por el contrario, el análisis de las fracciones 3 y 6 muestra que están compuestas mayoritariamente por trazas de picos pertenecientes a otras fracciones.

En cuanto a la determinación del contenido de péptidos totales para cada fracción, el patrón de distribución de contenido es prácticamente constante entre lotes cuando se realiza la determinación mediante el método de BCA. Sin embargo, se aprecian variaciones entre lotes con respecto a la proporción en que se encuentra

el contenido peptídico de cada una cuando se realiza la determinación por medición de absorbancia a 280 nm, además de que existe una marcada diferencia en el contenido de péptidos en las fracciones de menor peso molecular entre ambas metodologías (medición de absorbancia a 280 nm y BCA), lo cual como ya se mencionó podría ser atribuido a la abundancia de moléculas de carácter aromático.

Con respecto al ensayo biológico de estimulación en células Jurkat con diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas, la fracción 4 es la única que muestra inducción en la producción de IFN- γ en los dos lotes que se evaluaron. Mientras que las fracciones 2 y 6 presentaron inducción de IFN- γ solo en el lote 14D12-A, así como la fracción 5 únicamente en el lote 13C09. Es importante considerar como factores en la producción de IFN- γ los siguientes:

Variaciones existentes entre lotes en cuanto a la presencia y proporción de las moléculas responsables de la actividad biológica en este modelo, las cuales no son perceptibles mediante los métodos utilizados en el análisis y caracterización fisicoquímica de las fracciones obtenidas y que podrían estar asociadas a la naturaleza del producto. Así como al procedimiento de fraccionamiento, pues si bien ya se mencionó que el análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas indica la presencia de un pico mayoritario y característico en las fracciones 1, 2, 4 y 5, existen también picos co-eluyentes procedentes de otras fracciones y que estos picos co-eluyentes pese a encontrarse en menor proporción con respecto al pico mayoritario de cada fracción, podrían tener un impacto en la actividad biológica.

Por otra parte y con respecto al modelo biológico empleado para evaluar la función biológica de las fracciones, si bien busca representar una parte importante de los fenómenos inmunológicos que ocurren tras la administración de Transferón® y el cual fue diseñado con base a que existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que este bioterapéutico ejerce su efecto principalmente en células T, favoreciendo la polarización de estas hacia un perfil Th1 y ocasionando un aumento en los niveles de IFN- γ (51, 52, 53, 57). Al tratarse de un modelo *in vitro* en el que se estudia una

respuesta específica ante un estímulo en una línea de celular aislada, no permite obtener una visión global de otras funciones biológicas que posiblemente podrían estar asociadas a cada una de las fracciones colectadas como resultado de la interacción con un sistema más complejo que involucre la participación de otras estirpes celulares así como las interacciones entre ellas y la influencia del microambiente en el que se encuentran dichas células. Es por ello que es necesario considerar el uso de otros modelos biológicos in vivo que permitan complementar la evaluación de la función biológica de las fracciones obtenidas, por supuesto teniendo como punto de referencia y comparación los resultados obtenidos en este primer análisis.

Por último y con el fin de que el presente trabajo sirva como base para el diseño y la realización de nuevos proyectos de investigación cuyo objetivo sea el de la caracterización completa de las especies moleculares que conforman Transferón®, así como el estudio de los mecanismos de acción a través de los cuales ejerce su acción terapéutica, resulta fundamental el análisis fisicoquímico de las fracciones que presentaron actividad biológica mediante técnicas que permitan el reconocimiento y la identificación de las moléculas y péptidos presentes en éstas, así como el uso de modelos biológicos alternativos mediante los cuales se pueda evaluar la función de las fracciones desde una perspectiva global como ya se mencionó anteriormente, pues de esta forma se podría llegar a establecer la relación molécula-actividad biológica. Sin duda, el llevar a cabo la separación de los componentes que conforman Transferón® (fraccionamiento) representa el mejor camino para realizar estudios acerca de la caracterización fisicoquímica y biológica de este bioterapéutico, pues representa un método de bajo costo y altamente reproducible que permite el enfoque hacia “partes” específicas de esta compleja mezcla, lo cual simplificaría en gran medida los análisis posteriores, la detección de posibles contaminantes y el desarrollo de nuevos productos.

8 CONCLUSIONES:

8.1 Se caracterizó el perfil cromatográfico de Transferón® mediante diferentes principios y condiciones analíticas, resultando ser el principio de exclusión molecular la mejor alternativa para realizar el fraccionamiento, pues permite la obtención de un mayor número de picos bien resueltos, así como mayor intensidad en la señal de cada pico.

8.2 Se realizó el fraccionamiento de 3 diferentes lotes de Transferón® bajo el método establecido en la estandarización, resultando ser reproducible y permitiendo la obtención de fracciones cuyos parámetros cromatográficos y fisicoquímicos son consistentes entre lotes, presentando variaciones únicamente en la proporción del contenido peptídico entre las fracciones de diferentes lotes, al cuantificar por medición de absorbancia a 280 nm.

8.3 El ensayo de actividad biológica en células Jurkat estimuladas con diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas de 2 lotes reveló a la fracción 4 como la única que presenta una actividad (inducción en la producción de IFN- γ) consistente entre lotes, mientras que las fracciones 2, 5 y 6 mostraron actividad biológica únicamente en uno de ellos.

9 BIBLIOGRAFÍA:

1. Medina, E., Merchand, G., Pavón, L., Vázquez, S., Pérez, G., Salinas, N., ... Pérez, S.M. (2014). *Batch to batch reproducibility of Transferón®*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 88, 289-294.
2. Kirkpatrick, C. H., (1975). *Properties and activities of Transfer Factor*. J. Allergy. Clin. Immunol. 55. 411-421.
3. Fudenberg, H., (1989). *Transfer factor: Past, present and future*. Rev. Farmacol. Toxicol. 29. 475-515.
4. Good, A.R., (1971). *Transfer factor*. Department of Pathology, University of Minnesota.
5. Murtz, M.D., Lankford, M.S., Bennett, G. (1974). *Biologic and clinical implications of transfer factor*. Southern Medical Journal. 837-840.
6. (1974). *Transfer factor*. British Medical Journal. No. 5916: 397-398
7. Kirkpatrick, C., (2000). *Transfer factors: Identification of conserved sequences in Transfer factor molecules*. Molecular medicine, 6. 332-341.
8. Kirkpatrick, C., (1980). *Transfer factor: Critical reviews in clinical laboratory science*. Rev. Clin. Lab. Sci. 87-122.
9. Buger, D., Vanderbark, A., Anderson, W., Vetto, M., Finke P., (1976). *Human transfer factor: Fractionation and biologic activity*. The Journal of Immunology 117 (3). 789-796.
10. Grob, J., Reymond, I., Hacki, M., Frcy-Wettstein. M., (1976). *Some physiochemical and biological properties of a transfer factor preparation and its clinical application in Transfer Factor: Basic Properties and Clinical Applications*, Academic Press, New York, 247.
11. Fudenberg. H. H., Lcvin. A. S., Spidla. L. E., Wybran. J... and Byers. V., (1974). *The therapeutic uses of transfer factor*, Hosp. Pract. 95.
12. Drutz. D. J., Catanzaro. A., (1978). Coccidioidomycosis. Rev. Respir. 17: 727
13. Bullock, W. E., Fields, J. P., Bandvias, M. W. (1972). *An evaluation of transfer factor as immunotherapy for patients with lepromatous leprosy*. New England. J. Medicine. 287: 1 053-1059

14. Hastings, R.C., Morales, M.J., Shannon, E.J., Jacobson, R.R., (1976). *Preliminary results in the safety and efficacy of transfer factor in leprosy.* International Journal of leprosy and other mycobacterial diseases. 44 (1-2)
15. Fudenberg, H. H. (1985). *Ophthalmologic Herpes Zoster: Complete remission in six hours with dialyzable transfer factor.* Clin. Lab. Immunol. 1(8) : 49-51
16. Peetoom. F., Florey. M. J. (1979). *Transfer factor (HZLTF) in treatment of disseminated Herpes zoster (AZ).* Academic Press 489: 753-755.
17. Steele, R. W., Myers, M. G., Vincent, M. M. (1980). *Transfer factor for the prevention of varicella zoster infection in childhood leukemia.* New Engl. J. Med. 303: 355-59
18. Anhmes. L. J. *Treatment of chronic aggressive hepatitis: corticosteroids or transfer factor?* Personal communication.
19. Sharma, M. K., Anaraki, F., Ala, F. (1979). *Preliminary results of transfer factor therapy of persistent cutaneous leishmania infection.* Clin. Immunol. Immunopathol. 12 (1): 83-90
20. Pachman, L. M., Kirkpatrick, C. H., Kaufman, D. B., and Rothberg, R. M. (1974). *The lack of effect of transfer factor in thymic dysplasia with immunoglobulin synthesis.* J. Pediatr. 84: 681
21. Levin, A. S., Spittle, L. E., Stita, D. P., and Fudenberg, H. H. (1970). *Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunologic deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor.* Proc. Natl. Acad. Sci 67: 821
22. Grisalli. C., RevillPrd, J. P., Betuel. H., Hatog, C., Touraine. J. L. (1973). *Transfer factor therapy in immunodeficiencies.* Biomedicine 18: 220.
23. Silverman, M., Mdu. S., Yanonch, S., Sorokh, C., Glade. P. (1979). *Transfer factor in the treatment of B-cell disorders: effects and potential risks, in Immune Regulators in Transfer factor.* Academic Press 1979: 471- 485
24. Bukowski, R. M., Deodhar, S., Hewlett, J. S., Greenstreet, R. (1983). *Randomized controlled trial of transfer factor in stage II malignant melanoma.* Cancer 51 (269): 72

25. Levin, A. S., Byers, V. S., Fudenberg, H. H., Wybran, J., Hackett, A. J., et al. (1975). *Osteogenic sarcoma: Immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor-specific transfer factor*. J. Clin. Invest. 55 :487-99
26. Franco, M. A., Mendoza, E., Benavides, P., Vera, M.E., Rodríguez, C. (2008). *Immunepotent CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients*. Cytoterapy 10 (5): 490-496
27. Strannegard, I. L., Hanson. L. A., Lindholm. L., Mobacken, H., and Strannegard. O., (1975) *Transfer factor in severe atopic disease*. Lancet, (2): 702
28. Khan, A., Sellars. W., Grater, W., Graham, M. F., Pflanzner, J., Antonetti. A., Bailey, J., and Hill. N.O. (1978). *The usefulness of transfer factor in asthma associated with frequent infections*. Ann. Allergy (40): 229.
29. Imko, M., Mokráò, V., Nyulassy, S. (1997). *Immunomodulatory therapy of the epilepsy with transfer Factor*. Bratisl Lek Listy 98: 234-237.
30. Fudenberg, H. H., Singh, V. K. (1988). *Immunodiagnosis and immunotherapy of patients with Alzheimer's disease*. In Immunology and Alzheimer's disease: 98-107.
31. Fudenberg, H.H., Coleman, M., Rosberger, D., Singh, V. J. (1988). *Immunotherapy of Autistic children*. Clin. Res. In press (4): 540-602
32. Hernandez, M.A., Mendieta, D., Pérez, M., Bojalil, R., Estrada, I., Estrada, S., and Pavón, L. (2013): *Effect of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Immunomodulator on Cytokines Levels: An Alternative Therapy for Patients with Major Depressive Disorder*. Clinical and Developmental Immunology. Hindawi 2013.
33. Lavanya, G., Mubarak, S.K., Sujana, K., Pramela Rani., B. Syama Sundar. (2011). *Protein chromatography*. J Biomed Sci and Res (3): 424-438.
34. General Healthcare, Amersham Biosciences. *AKTA FPLC System Manual*. Edición AE. 2003.
35. Schmid, F.X. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible spectrophotometry*. Encyclopedia of Life Sciences.

36. Garcia Dominguez, J. A., Diez, J.C. (2001). *Retention Parameters in Chromatography*. Pur. Appl. Chem. 73 (6): 969-992.
37. Walls, D., Loughran, T. (2011). *Protein Chromatography: Principles and Methods*. Methods in molecular biology vol. 681. Human Press
38. Hong, P., Koza, S., and S. P. Bouvier. *A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 35: 2923–2950.
39. General Healthcare, Amersham Biosciences. *Gel Filtration: Principles and Methods Handbook*. Edición A. 2002.
40. Tosoh Biosciences. *Hidrofobic Interaction Chromatography*.
41. General Healthcare, Amersham Biosciences. *Hydrofobic Interaction and reversed phase chromatography*. Principles and Methods Handbook. Edición A. 2006.
42. General Healthcare, Amersham Biosciences. *Ion Exchanger Chromatography and chromatofocusing*. Principles and Methods Handbook. Edición A. 2004.
43. General Healthcare, Amersham Biosciences. *Affinity Chromatography*. Principles and Methods Handbook. Edición A. 2007.
44. Lawrence, H. S., Al- Askari, S., David, J., Franklin, E. C., and Zweiman, B., (1963). *Transfer of immunological information in humans with Dialyzates of leukocyte extracts*. Tram. Ass. Amer. PhsGans: 76-84
45. Zuckerman, K., Neidhart, J., Balcerzak, S. *et al* (1974). *Inmunologic specificity of transfer factor*. J. Clin. Invest 54: 997-1000.
46. Neidhart, J., Schwartz, R., Hurtubise, P., Murphy, G., Metz, E., Stanley P. Lobuglio, A. (1973). *Transfer Factor: isolation of a Biologically Active Component*. Celular immunology 2 (9): 319
47. Baram, P., Mosko, M. M. (1962). *Chromatography of the human tuberculin delayed-type hypersensitivity transfer factor*. J. Allergy 33: 498.
48. Baram, P., Yuan, L., Mosko, M. M. (1966). *Studies on the transfer of human delayed type hypersensitivity*, J. Immunol. 97:407.
49. Kirkpatrick. H.C (2000). *Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules*. Molecular medicine 6 (4): 332-341.

50. Pérez, R., Chávez, R., Estrada, I., Padilla, S., Cortés, R. and Estrada, S., (2007). *Indications, usage and dosage of the Transfer Factor*. Revista Alergia México 54 (4): 134-139.
51. Estrada, S., Nagaya, A., Serrano, E., Rodríguez, O., Santamaría, E. and Estrada, I. (1998). *Comparative study of Transfer Factor and Acyclovir in the treatment of Herpes Zooster*. International Journal of Immunopharmacology 20: 521-535
52. Santacruz, C., Aguilar, G., Estrada, S., Pérez, M., Jiménez, M. (2010). *Dialyzable leucocyte extracts (Transfer factor) as adjuvant therapy for fungal keratitis*. The American Journal of Cases Reports 11: 97-101
53. Contreras, A., Vizuet, L., Rivera, E., Serafin, J., Estrada, I., Estrada, S. and Jimenez, C. (2010). *Down regulation of IL-8 and IL-6 in human limbal epithelial cells cultured with human dialyzable leucocyte extracts*. Revista Alergia México 58 (3): 147-154.
54. Hernandez, M., Mendieta, D., Pérez, M., Bojalil, R., Estrada, I., Estrada, S., Pavón, L. (2013). *Effect of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Immunomodulator on Cytokines Levels: An Alternative Therapy for Patients with Major Depressive Disorder*. Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology 2013: 1-11
55. Salinas-Jazmín, N., Estrada, S., Becerril, M., Limón, A., Vázquez, S., Medina, E., Pérez, S. (2014). *Herpes Murine Model as a Biological Assay to Test Dialyzable Leukocyte Extracts Activity*. Hindawi Publishing Corporation. Journal of Immunology Research. 2014: 1-9.
56. Homborg, T., Saenz, V., Galicia, J., Lara, I., Cervantes, E., Andaluz, M., Vera, E and Jiménez, M. (2015). *The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferón® (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report*. Pharmacology & Pharmacy, 2015 (6): 65-74
57. Luna Baca, G.A., Linares, M., Santacruz Valdez, C., Aguilar Velazquez, G., and Jimenez Martinez, M.C. *Inmunological Study of Patients with herpetic keratitis stromal treated with Dialyzable Leucocyte Extract*. MEDIMOD. 2007: 21-25.

58. Hatanaka, E., Shimomi, M. F., Curi, R., Campa, A., *Sodium Chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide stimulated human neutrophils and mononuclear cells*. Shock Society. 2002: 27-1.
59. Cardillo, M., Vieira, H., Frediani, D., Petroni, R., García, F., *Hypertonic saline solution reduces the inflammatory response in endotoxemic rats*. Facultad de Medicina Universidad de Sao Paulo. 2012: 67.