

Desescalado del proceso de producción de HEBERTRANS® para su validación viral

✉ María A Tuñón¹, Enrique Noa², Kosara Sánchez¹, Ignacio J Ruibal², Marta Dubed², Francisco Castañeda¹, Giselle Álvarez², Eduardo Sánchez¹

¹Departamento de Producción de Factor de Transferencia, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Calle 134 e/ 25 y 23, AP 6996, CP 10600, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: maria.antonietta@cigb.edu.cu; Fax: (537) 2718070

²Laboratorio de Investigaciones del SIDA
Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de Las Lajas, CP 32700, La Habana, Cuba
Fax: (537) 574009

RESUMEN

La necesidad de alcanzar el máximo de seguridad en la obtención de productos biológicos, ha impuesto a los productores y agencias reguladoras, el desarrollo y establecimiento de una estrategia encaminada a minimizar el riesgo de contaminación viral. En este sentido, es muy importante la validación de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción, para lo cual este debe ser transferido a una menor escala productiva (desescalado). Los productos generados por los procesos a pequeña y gran escala deben ser similares en términos de pureza, potencia y rendimiento. En este trabajo se presentan los resultados del control de la calidad del HEBERTRANS® producido a escala analítica, así como los estudios de toxicidad celular e interferencia viral de las muestras iniciales de las etapas que se necesita desafiar en el estudio de validación viral del proceso de producción. El desescalado del proceso de producción al 1% permitió obtener un producto que cumple con los parámetros de calidad, los cuales no se afectan por la falta de inducción de las células con el virus *Sendai*, ni por la adición del medio de cultivo suplementado en una proporción de 1:5. La citotoxicidad de las muestras iniciales de las etapas del proceso de producción fue baja y estuvo relacionada con la concentración de materia orgánica en ellas. Ninguna mostró interferencia sobre la replicación de los modelos virales seleccionados para el estudio de validación viral del proceso de producción de HEBERTRANS®.

Palabras claves: desescalado, validación viral, extracto dializable de leucocitos

Biotecnología Aplicada 2004;21:229-233

ABSTRACT

Scale down of HEBERTRANS® production process for viral validation. The need to reach a maximum security when obtaining biological products has imposed the development and establishment of a strategy guided to minimize the risk of viral contamination to manufacturers and regulatory agencies. Here the validation of the viral clearing capacity of the production process plays an important role, for which reason it should be transferred to a smaller productive scale (scaling down). The products generated by the down scaling and the manufacturing processes should be similar in terms of purity, power and yield. This paper presents the quality control results of HEBERTRANS®, which is produced at an analytical scale, as well as the studies of cellular toxicity and the viral interference of the initial samples of the crucial steps in the viral validation of the manufacturing process. The down scaling of the production process to 1% led to a product that meets all the required quality parameters; these are not affected by the lack of cell induction with the virus *Sendai*, or by the addition of the supplemented cell culture at a proportion of 1:5. The cytotoxicity of the initial samples of the steps of the manufacturing process was low, and it correlates with the concentration of organic matter. None of them showed an interference on the replication of the viral models selected to study the viral validation of the manufacturing process of HEBERTRANS®.

Keys words: scale down, viral validation, dialyzable leucocytes extracts

Introducción

La sangre humana es una gran fuente de materia prima de productos biológicos, los cuales pueden ser extraídos de las células rojas, leucocitos o plasma, a partir de donaciones independientes o de grandes lotes de cientos de donaciones [1].

El riesgo de contaminación viral es una característica común a todos los productos biológicos para cuya fabricación se emplea material de origen humano o animal. Esta contaminación viral puede

ser a partir del material de origen, de un agente viral adventicio introducido en el proceso de producción y/o por el incumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación [2-5].

El HEBERTRANS® es un extracto dializable de leucocitos humanos, que se obtiene de la ruptura y diálisis de estos y que tiene la propiedad de transferir inmunidad mediada por células. Se produce en Cuba desde hace más de 15 años, con resultados satisfactorios

1. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev.* 2000;14:94-110.

2. Chamberland M, Khabbaz RF. Emerging issues in blood safety. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12:217-29.

en el tratamiento de enfermedades virales e inmunológicas, así como en el tratamiento de pacientes VIH seropositivos [6-8].

En el proceso de producción de HEBERTRANS® se emplean diferentes materias primas de origen humano y animal (leucocitos humanos, suero humano agamma, virus *Sendai*, interferón recombinante y embriones de pollos), las cuales están parcialmente caracterizadas para los posibles contaminantes virales.

Ante la necesidad de alcanzar el máximo de seguridad en la obtención de productos biológicos, los productores y las agencias regulatorias se han impuesto una estrategia encaminada a minimizar el riesgo de contaminación viral. En este sentido, se han adoptado los enfoques complementarios siguientes [2, 4, 9, 10]:

- Selección y examen del material original, para detectar la presencia de marcadores virales.
- Introducción de etapas específicas de aclaramiento viral durante el proceso de producción.
- Estudio de la capacidad de aclaramiento viral del proceso de producción (validación viral).
- Examen del producto en etapas del proceso de producción, para la detección de contaminantes virales.
- Ensayos clínicos de farmacovigilancia.

Ninguno de estos niveles de control por sí solo garantiza la seguridad del producto final, esto solo se logra con la combinación de ellos. Poco a poco los estudios de validación viral se han convertido en una parte necesaria y fundamental para garantizar los objetivos de aseguramiento de la calidad de un producto por parte de los fabricantes, y en una exigencia importante de las agencias regulatorias nacionales e internacionales para la comercialización. Suministrar un producto efectivo y seguro es una obligación ética de cualquier productor de medicamentos [5, 10].

Para estudiar el proceso de producción, este debe ser llevado a un desescalado y comparado con el de la escala industrial, mediante técnicas que avalen su capacidad para obtener un producto con características muy similares a las del proceso industrial. Cada etapa debe ser comparada en términos de temperatura, tampones, concentración de solventes, pH, flujos y otros. Los productos generados por los procesos a pequeña y gran escala deben ser similares en términos de pureza, potencia y rendimiento [9, 11].

Otro paso importante en la validación viral de un producto es el estudio de reto simulado, con el cual se demuestra la influencia que tiene el medio de cultivo que contiene el agente infeccioso, en la proporción con que se va a retar sobre los diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos establecidos para el producto [10-12].

En el diseño de los estudios de validación debe tenerse en cuenta la composición de las muestras de las etapas que se han de retar, lo cual puede causar problemas significativos en la titulación de los modelos virales [9-13].

El objetivo de este trabajo fue ajustar las condiciones (desescalado, reto simulado, citotoxicidad e interferencia viral) del proceso de producción de HEBERTRANS® para el estudio de validación viral.

Materiales y métodos

El HEBERTRANS® (nombre comercial del extracto dializado de leucocitos con actividad de factor de

transferencia [FT]), es el producto de la lisis y diálisis al vacío en solución balanceada de sales (PBS) de leucocitos provenientes de donaciones voluntarias de sangre [6].

Proceso de producción del factor de transferencia

El proceso de producción de HEBERTRANS® consta de una etapa inicial de purificación, estimulación e inducción de los leucocitos, que posteriormente se someten a centrifugación para obtener el crudo de interferón y las células, a partir de las cuales se purifica el factor de transferencia (figura 1).

3. World Health Organization (WHO). Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. Expert committee on biological standardization. Geneva, November 2001.
4. WHO. Requirement for collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives. WHO. 1994. Technical Report Series No. 840, annex 2.
5. CECMED. Directrices sobre las Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos. Regulación 16/2000. Cuba.

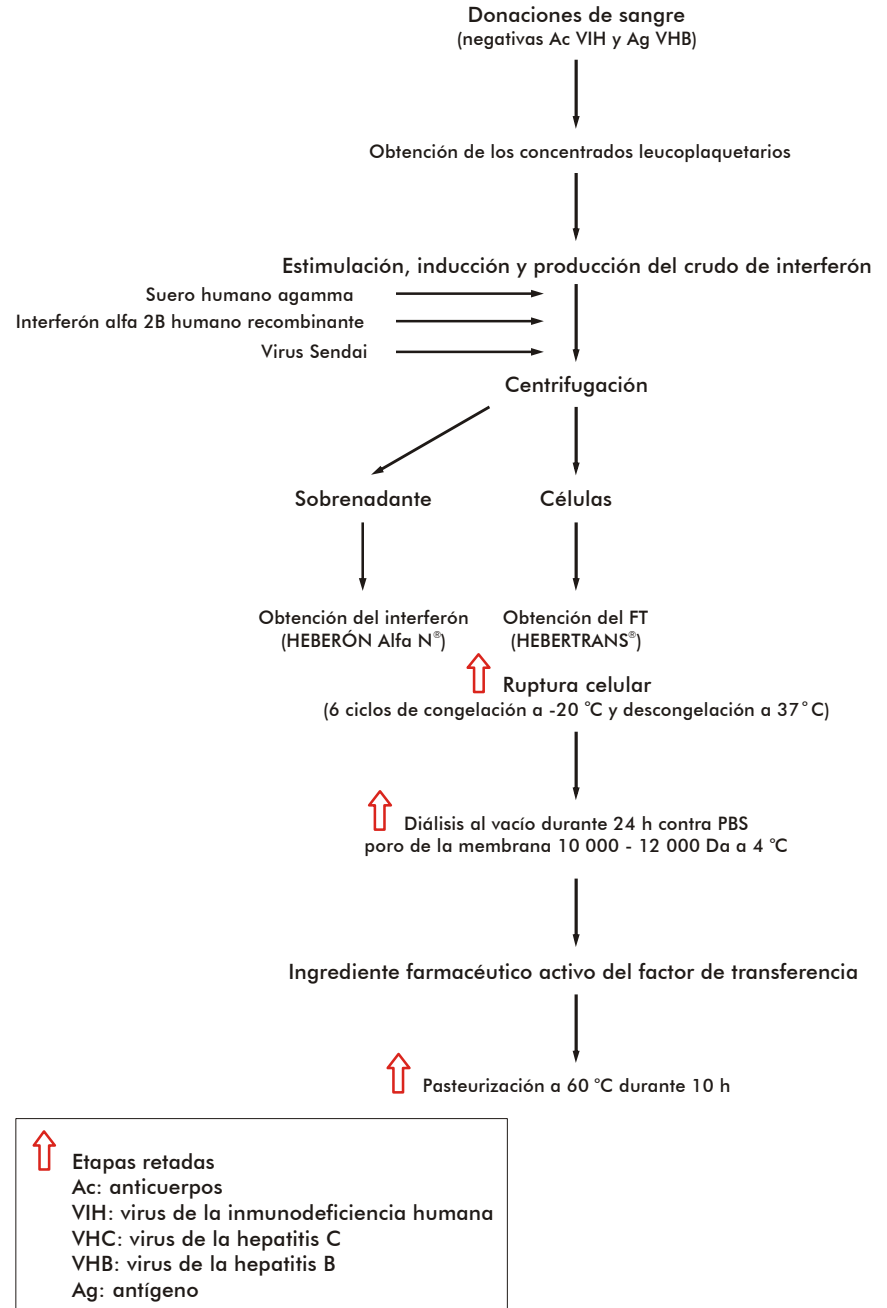


Figura 1. Proceso de producción del factor de transferencia.

↑ Etapas retadas
 Ac: anticuerpos
 VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
 VHC: virus de la hepatitis C
 VHB: virus de la hepatitis B
 Ag: antígeno

Desescalado del proceso de producción

El desescalado del proceso de producción se inicia a partir del concepto de que 1 U de FT es el resultado de la diálisis al vacío en solución salina de 5 x 10⁸ leucocitos.

El proceso de producción de HEBERTRANS® se redujo hasta una escala del 1%. Se utilizaron leucocitos inducidos y no inducidos con el virus *Sendai*, para lo cual se emplearon tres lotes independientes de cada uno. La etapa de diálisis se realizó al vacío con una presión de 75 mm de mercurio.

Estudio de reto simulado del proceso de producción

A los paquetes de células no inducidas con el virus *Sendai* (3 lotes), después de la etapa de ruptura celular, se les adicionó el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 2 mM de L-glutamina (Flow) y 40 µg de gentamicina (Gibco), en una proporción de 1:5 y de 1:10 con respecto al volumen de PBS con que se dializó. Luego se sometieron al proceso de producción descrito en la figura 1.

Control de la calidad a las muestras del desescalado y del reto simulado

A las muestras del desescalado y del reto simulado se les realizaron, por duplicado, las pruebas de determinación de proteínas y de actividad biológica por los métodos establecidos.

La actividad biológica del FT se determinó por dos métodos: el primero, el índice de inhibición del factor de migración leucocitaria (LIF). Varios autores han reportado la capacidad del extracto dializable de leucocitos de estimular la producción del LIF, proteína producida por leucocitos sensibilizados después de la incubación con antígenos específicos [14].

El otro método fue el ensayo de hipersensibilidad cutánea retardada (DTH). Este ensayo permite definir la capacidad del FT para transferir inmunidad mediada por células en forma de antígeno específico, de un individuo sensible a otro no sensible, y de esta forma predecir la respuesta humana ante el tratamiento con FT [15].

La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Lowry [16].

Estudios de citotoxicidad e interferencia viral

Los estudios de citotoxicidad e interferencia viral se aplicaron a las muestras iniciales de las etapas del proceso de producción que se debían retar (ruptura celular, diálisis y pasteurización), señaladas en la figura 1. Estos estudios se realizaron por triplicado.

Citotoxicidad

Las muestras se procesaron en dependencia de la concentración inicial de materia orgánica de la etapa que se iba a retar:

- Etapa de alta concentración de materia orgánica (ruptura celular y dentro de la diálisis): dilución de 1:5 ó 1:10 en PBS con pH 7.2.

- Etapa de baja concentración de materia orgánica (fuera de la diálisis y pasteurización): dilución de 1:2 en PBS con pH 7.2 o puras.

Para determinar la citotoxicidad, a las muestras se les realizaron diluciones seriadas, iguales a las de la

titulación viral, y se les adicionó la concentración celular específica para cada sustrato celular. Se observó el día de máximo efecto citopático (ECP) de cada uno de los modelos virales que se replicaron en ellas y se compararon con controles celulares, para determinar hasta qué dilución fueron tóxicas para cada sustrato, teniendo en cuenta la morfología y viabilidad.

Interferencia viral

Se diluyeron los diferentes modelos virales en las muestras iniciales de las etapas que se debían retar y se realizó la titulación viral, según el método de Johnson y Byrington [17]. Los títulos virales se calcularon según el procedimiento de Reed y Muench [18]. El título viral obtenido se comparó con el de los modelos virales diluidos en el medio de cultivo suplementado.

Los modelos virales que se seleccionaron para la validación de la capacidad de aclaramiento viral de HEBERTRANS® se muestran en la tabla 1.

Para determinar si existían diferencias significativas entre la carga viral de los modelos virales diluidos en el medio de cultivo suplementado y los modelos de las muestras iniciales de las etapas que se debían retar en el estudio de interferencia viral, se empleó la prueba de la t de Student para los datos pareados.

Resultados y discusión

El diseño del proceso de producción a escala de laboratorio es crucial en el desarrollo de un estudio de validación viral. Este consiste en reproducir los pasos y procedimientos correspondientes en una escala inferior a la del proceso productivo, de manera que se facilite el trabajo de laboratorio. Debido a los grandes volúmenes que se emplean en las plantas productoras, es imposible realizar un estudio de validación a esa escala, por lo tanto, se recomienda realizar un desescalado del proceso, que puede alcanzar hasta el 0.1% del nivel industrial. Para ello, las condiciones experimentales deben ser lo más idénticas posibles al proceso real y es preciso demostrar que con este desescalado se obtiene un producto con los mismos parámetros de calidad [12, 19, 20].

En la tabla 2 se presentan los resultados del estudio de control de la calidad de las muestras obtenidas del desescalado al 1% del proceso de producción, para las células inducidas y para las no inducidas con el virus *Sendai*. Los parámetros de calidad analizados se

6. Fernández F, Suárez M, Díaz W, Gerónimo H, Porrero F, Fernández-Ortega C. Efecto de la pasteurización sobre algunas propiedades del Factor de Transferencia. *Biotecnología Aplicada* 1998;15:22-4.

7. Fernández C, Guillauma E, Araña MJ, Valdés A, López P. Transfer of delayed type hypersensitivity to several antigens in humans employing dialyzable leukocyte extract. Research and application of transfer factor and DLE. Proceedings of the Sixth International Workshop on Transfer Factor. Xue Yuan Press 1989:37-48.

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

9. Committee for Proprietary Medical Products (CPMP). Virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit 1996; CPMP/BWP/269/95 Final version-2:1-13.

10. Horowitz B, Ben-Hur E. Efforts in minimizing risk of viral transmission through viral inactivation. *Ann. Med.* 2000;32:475-84.

11. International Conference on Harmonization Viral Safety Document: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. International Conference on Harmonization and Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1997.

12. Connor S. Consideration in downscaling protein purification processes. *Technical Bulletin Q-One Biotech Ltd* 1998; 11:1-6.

13. Sofer G. Validation: Ensuring the accuracy of scaled-down chromatography models. *Biopharm* 1996;9(9):51-4.

14. Wilson GB, Fort JD. Interspecies transfers of cell-mediated immunity using specific immunity inducers with known potency. Prevention in selected diseases. Leukocyte Dialysates and Transfer Factor. Proceeding of the Fifth International Symposium on Transfer Factor. V. Mayer and J. Borvák (eds.) 1987;333-58.

Tabla 1. Modelos virales empleados en la validación de la capacidad de aclaramiento viral de HEBERTRANS®.

Modelo viral	Genoma/ envoltura	Tamaño (nm)	Resistencia	Modelo	Sustrato celular
VDVB	ARN/envuelto	45 - 60	Moderada	Virus ARN envueltos y del virus de la hepatitis C	MDBK
VIH-1	ARN/envuelto	80 - 100	Baja	Retrovirus	MT-4
PI-3	ARN/envuelto	150 - 300	Baja	Virus <i>Sendai</i>	Vero 1008
Polio II	ARN/ no envuelto	25 - 40	Alta	Virus ARN no envueltos y del virus de la hepatitis A	Vero 1008
VHP-1	ADN/envuelto	150 - 200	Baja a moderada	Virus ADN envueltos y virus de la hepatitis B	Vero 1008
Parvovirus	ADN/no envuelto	18 - 26	Muy alta	Virus ADN no envueltos y del parvovirus B19	LFBC

VDVB: virus de la diarrea viral bovina cepa NADL; VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 cepa IIIIB; PI-3: virus de la parainfluenza humana tipo 3 cepa MK9; polio II: virus de la poliomielitis tipo II cepa *Sabin II*; VHP-1: virus del herpes porcino tipo 1 cepa *Sithendal*; parvovirus: parvovirus canino cepa autóctona número 7164.

encontraban entre los límites de aceptación establecidos, tanto para las células inducidas como para las no inducidas.

Los resultados de la concentración de proteínas en los lotes del desescalado de este estudio son mayores que los reportados por Fernández y cols. en 1998 [6], quienes plantean que con el tratamiento térmico del IFA hay pérdida de proteínas. Esto pudiera deberse a la presión de vacío empleada en el presente estudio (75 mm de mercurio), dato no reportado por estos autores. Entre los factores mecánicos que ayudan a la distorsión del poro de la membrana de la diálisis y a una mayor salida de soluto de ella está la presión a la cual es sometida [21].

En la tabla 3 se presentan los resultados del control de la calidad de los lotes de HEBERTRANS® producidos del estudio de reto simulado. Este estudio se realizó solo para las células no inducidas con el virus *Sendai*. La adición del medio de cultivo suplementado en una proporción de 1:5 ó 1:10 no altera los parámetros de calidad del FT.

Los valores de concentración de proteína en los lotes del reto simulado, al igual que en los del desescalado, fueron mayores que los reportados por Fernández y cols. en 1998 [6]. En los lotes del reto simulado, la concentración fue mayor que en los del desescalado, lo cual se debe a la presión de vacío a que es sometida la membrana de diálisis y al suero fetal bovino adicionado al medio de cultivo.

Las membranas de diálisis se caracterizan por un peso molecular al cual es retenido el 90% del soluto. El paso de la molécula del soluto a través de la membrana depende de su velocidad de difusión, tanto en la solución como a través de la membrana. Como un primer paso en la permeabilización, la molécula debe difundirse a través de la membrana hacia el exterior. La velocidad de difusión es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del peso molecular del soluto, por lo tanto, las moléculas grandes permeabilizarán la membrana más lentamente que las pequeñas. Otros factores que afectan la permeabilización de la membrana son el pH, la fuerza iónica, las fuerzas mecánicas y el tiempo de filtración, los cuales pueden modificar la naturaleza amorfa del gel de celulosa y, consigo, el tamaño del poro de la membrana [21].

La presión negativa a que es sometida la membrana durante 24 h es un parámetro importante que se controló en el estudio de validación, al igual que en el proceso productivo. Esto se debe a que en la validación viral de HEBERTRANS®, la salida de una mayor o menor carga viral está influenciada principalmente por la presión de vacío y por la concentración de proteínas dentro de la membrana. La compatibilidad entre el proceso real y el modelo constituye la premisa para que los resultados con el sistema a pequeña escala puedan ser aceptados en la evaluación de la seguridad viral del producto [11, 20, 22].

Estudio de citotoxicidad

Tomando en cuenta los resultados del estudio de citotoxicidad para cada uno de los sustratos celulares, se seleccionaron como diluciones de trabajo para las muestras con alta concentración de materia orgánica (ruptura celular y dentro de la diálisis), la dilución 1:10, en la que solo se detecta toxicidad en los diferentes sustratos celulares en la dilución 4⁻¹; mientras que en

Tabla 2. Resultados del desescalado del proceso de producción del FT para las células inducidas y las no inducidas con el virus *Sendai*.

Especificaciones de los índices de calidad	Límites de aceptación	Desescalado*	
		Células inducidas	Células no inducidas
Inhibición de la migración de los leucocitos	Índice de migración ≤0.8. Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Hipersensibilidad cutánea retardada	p<0.05 con el placebo y nds con el control positivo. Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Concentración de proteínas	≥0.698 mg/mL	0.768	0.716
Prueba de esterilidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba

* n = 3

las muestras diluidas 1:5, la toxicidad alcanza hasta la dilución 4⁻⁴. En el caso de las muestras con baja concentración de materia orgánica (fuera de la diálisis y pasteurización), la citotoxicidad de las muestras puras fue muy baja (4⁻¹), lo cual permite utilizarlas sin ningún procedimiento previo (tabla 4).

Estudio de interferencia viral

En la tabla 5 se presentan los resultados del estudio de interferencia viral de las muestras de las etapas que se han de retar para la validación viral del proceso de producción de HEBERTRANS®. Este estudio se realizó con una dilución del virus de 1:5 en las muestras iniciales

15. Viza D, Vich JM, Phillips J, Davies DAL. Use specific transfer factor for the prevention or the treatment of herpes infections in mice and in man. *Journal Experimental Pathology* 1987;3(4):407-20.

16. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 1977;83(2):346-56.

17. Johnson VA, Byrington RE. Infectivity Assay (Virus Yield Assay). In: Aldovani A, Walker BD, eds. *Technique in HIV Research*. Stockton Press, New York;1990.p.71-6.

Tabla 3. Resultados del reto simulado del proceso de producción del FT para las células no inducidas con el virus *Sendai*.

Especificaciones de los índices de calidad	Límites de aceptación	Reto simulado*	
		1:5	1:10
Inhibición de la migración de los leucocitos	Índice de migración ≤0.8. Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Hipersensibilidad cutánea retardada	p<0.05 con el placebo y *nds con el control positivo. Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Concentración de proteínas	≥0.698 mg/mL	1.226	1.213
Prueba de esterilidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba

*n = 3

*nds: no diferencias significativas

Tabla 4. Resultado del estudio de toxicidad de las muestras iniciales de las etapas retadas.

Sustrato celular	Muestras del proceso de producción							
	Ruptura celular*		Fuera de la diálisis*		Dentro de la diálisis*		Pasteurización*	
	1:5	1:10	Puro	1:2	1:5	1:10	Puro	1:2
MDBK	Tóxico (4 ⁻²)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico	No tóxico	Tóxico (4 ⁻³)	Tóxico (4 ⁻²)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico
MT4	Tóxico (4 ⁻³)	Tóxico (4 ⁻¹)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico	Tóxico (4 ⁻⁴)	Tóxico (4 ⁻²)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico
Vero	Tóxico (4 ⁻³)	Tóxico (4 ⁻¹)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico	Tóxico (4 ⁻⁴)	Tóxico (4 ⁻²)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico
LFBC	Tóxico (4 ⁻³)	Tóxico (4 ⁻¹)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico	Tóxico (4 ⁻⁴)	Tóxico (4 ⁻¹)	Tóxico (4 ⁻¹)	No tóxico

*n = 3

Tabla 5. Estudio de interferencia viral de las muestras de las etapas retadas del proceso de producción de HEBERTRANS®.

Muestras	Modelos virales					
	VDVB*	VIH-1*	PI-3*	Polio II*	VHP-1*	Parvovirus*
Dentro de la diálisis	6.019	5.838	5.878	6.819	6.410	7.203
Fuera de la diálisis	6.070	6.821	6.040	7.204	7.199	8.152
Pasteurización	6.389	6.710	6.051	7.271	7.121	7.810
Control viral*	6.778	7.020	6.778	7.469	7.213	8.449

*log DIC₅₀/mL n = 3

de las etapas retadas, tomando en cuenta que en el reto simulado los parámetros de calidad de este producto no se alteran por la adición del medio suplementado en esta proporción. Además, como se demostró en el estudio de toxicidad, en las muestras que poseen alta concentración de materia orgánica, es necesario realizar una dilución de 1:10, por lo que este procedimiento provoca una pérdida de 1 log de la carga viral de los modelos virales con los que se retan estas etapas.

Las muestras de las etapas retadas no tienen interferencia sobre la replicación de los modelos virales estudiados. La disminución de los títulos virales es menor que 1 log en relación con el control viral de los modelos virales diluidos en el medio de cultivo suplementado para las muestras fuera de la diálisis y la pasteurización (tabla 5). Para el caso de la muestra que permanece dentro de la diálisis, esta disminución oscila entre 1 y 2 log. A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas con respecto a los modelos virales diluidos en el medio de cultivo.

La composición de las muestras iniciales de las etapas que han de desafiar en un estudio de validación viral de un proceso de producción, puede alterar los resultados. Las muestras pueden ser citotóxicas para las células indicadoras o interferir la visualización del efecto citopático de los virus o la capacidad de estos para infectar las células. La interferencia no puede ser medida por el estudio de citotoxicidad, ya que las muestras que no son citotóxicas en muchos casos pueden mostrar una interferencia significativa [9, 13, 19].

Es importante destacar que en este estudio no se detectó ninguna actividad de interferencia para los modelos virales empleados. Esto no está en contradicción con los reportes de actividad antiviral del factor de transferencia [8, 23, 24], pues los modelos virales que se emplearon son de origen animal, con excepción del VIH y del poliovirus tipo 2. Además, las cargas virales con que se retaron las etapas son muy superiores a las que se utilizaron en los estudios anteriores y las que podían ser detectadas, en las personas afectadas por estas enfermedades.

Conclusiones

El desescalado al 1% del proceso de producción de HEBERTRANS® permite obtener un ingrediente farmacéutico activo que cumple con los parámetros de calidad del producto obtenido a escala industrial. Estos parámetros no se afectan por la falta de inducción de las células con el virus *Sendai*, ni por la adición del medio de cultivo suplementado en una proporción de 1:5. El procesamiento de las muestras iniciales de las etapas que se debían retar permitió eliminar la toxicidad de estas y no se detectó interferencia viral de las muestras iniciales con los modelos virales estudiados. En este estudio se ajustaron los parámetros (escala del proceso, proporción a la que se adicionaron los modelos virales a las etapas que se deben retar, procesamiento de las muestras y materia prima) para la validación viral del proceso de producción de HEBERTRANS®.

18. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.

19. Darling A. Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation. *Molecular Biotechnology* 2002;21:57-83.

20. Larzul D. Viral validation design of a manufacturing process. *Develop Biol Standard* 1999;99:139-50.

21. Blahitka J. Achieve peak performance in ultrafiltration. *Water Technology Magazine*. 1995.

22. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medical Products (CPMP). Note for Guidance on Plasma-Derived Medicinal Products. CPMP/BEP/269/95 rev 3, 2001.

23. Cabezas R, Estrada S, Padierna I, Fernández-Ortega C, López P. Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con herpes zoster. *Biología Aplicada* 1990;7:52-7.

24. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ruibal I, Vilarrubia OL, Menéndez de San Pedro JC, Navea L, Ojeda M, Araña MJ. Inhibition of *in vitro* HIV infection by dialysable leucocytes extracts. *Biotherapy* 1996;9:33-40.

Recibido en octubre de 2003. Aprobado en octubre de 2004.