












Transferon® en el 2020

Transferon® in 2020

Pérez-Tapia, S. M.^{*1,2,3} , Vallejo-Castillo, L.¹ , López-Morales, C. A.¹ , Mellado-Sánchez, G.¹ ,
Pavón, L.^{*4} , Nieto-Patlán, A.¹ , Velasco-Velázquez, M. A.⁵ , Medina-Rivero, E.¹ , Estrada-Parra, S.² .

¹Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

²Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

³Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+) para Farmacoquímicos y Biotecnológicos, LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT, Ciudad de México, México.

⁴Laboratorio de Psicoimmunología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Ciudad de México, México.

⁵Departamento de Farmacología y Unidad Periférica de Investigación en Biomedicina Traslacional (CMN 20 de noviembre, ISSSTE), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Pérez-Tapia, S. M., Vallejo-Castillo, L., López-Morales, C. A., Mellado-Sánchez, G., Pavón, L., Nieto-Patlán, A., Velasco-Velázquez, M. A., Medina-Rivero, E., Estrada-Parra, S. (2020). Transferon® in 2020. *Revista Bio Ciencias* 7, e901. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e901>



Immunotherapy has become very important in medicine thanks to the Nobel Medicine prize awarded to James P. Allison and Tasuku Honjo in 2018, for their discoveries in key molecules to the regulation of the immune response (CTLA4 and PD1) (Ishida *et al.*, 1992; Leach *et al.*, 1996). Immunotherapy consists on the modification of any element of the immune response to promote the prognosis of a pathology. There is extensive evidence of its benefits and importance in autoimmune diseases and cancer (Nishimura *et al.*, 1999; Yang 2015). From the second half of the past century, studies have reported the use of human dialyzable leukocyte

La inmunoterapia ha adquirido gran importancia en la medicina actual debido a la condecoración de James P. Allison y Tasuku Honjo con el premio Nobel de Medicina de 2018, por sus descubrimientos sobre moléculas clave en la regulación de la respuesta inmunológica (CTLA4 y PD1) (Ishida *et al.*, 1992; Leach *et al.*, 1996). La inmunoterapia consiste en modificar algún elemento de la respuesta inmunológica para favorecer la prognosis de una patología; existe gran evidencia de sus beneficios e importancia en enfermedades como el cáncer y enfermedades autoinmunes (Nishimura *et al.*, 1999; Yang, 2015). Desde mediados del siglo pasado, se reportó que el uso de extractos dializables de leucocitos humanos (hDLE) como inmunoterapéutico con un posible efecto inmunomodulador. Diversos estudios han demostrado que los hDLE tienen la capacidad de modificar la respuesta inmunológica. En los años 1970s el Dr. Sergio Estrada Parra comenzó a escala de laboratorio la producción de dializados de extractos leucocitarios

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 10th 2019.

Accepted/Aceptado: January 15th 2020.

Available on line/Publicado: January 16th 2020.

*Corresponding Author:

Pérez-Tapia, S. M., Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) IPN, Ciudad de México, México, E-mail: sperez@udibi.com.mx

Pavón, L., Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México., Laboratorio de Psicoimmunología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Ciudad de México, México. Phone +52(55) 4160 5082, Fax +52(55) 5675 9980, E-mail: lkuriaki@imp.edu.mx

extracts (hDLE) as immunotherapy with a possible immunomodulatory effect. Several studies have proven that hDLE can modify the immune response. In the 1970s, Dr. Sergio Estrada Parra started the production of hDLE at laboratory scale in Mexico. In recent years, his efforts were completed with the patent registration of an industrial scale manufacturing process, which allows for its protection in USA, Mexico, Colombia and, recently, the European Union.

Transferon® is a blood-derived product with immunomodulatory properties composed of a mixture of low-molecular weight peptides (<10 kDa) originated from human leukocyte rupture. It is considered a complex drug and has batch-to-batch reproducibility.

Transferon® production is conducted under strict quality standards that result in a robust manufacturing process. The release of Transferon® batches is done complying with quality specifications, which are based on the physicochemical and functional characterization of the product.

Over 15,000 patients are currently benefited with the use of Transferon® every year, which has been proven to be an effective adjuvant in the treatment of diseases such as allergy, autoimmunity, and infections. These pathologies involve a failure or deregulation of the immune system, hence the immunomodulatory ability of Transferon® is of great importance, which has been proven through *in vitro* assays and animal models.

It must also be considered that Transferon® has been proven to be safe and has gone through a pharmacovigilance process for the past eight years, which has reported no serious adverse effects. In addition, UDIMEB¹, through USEIC², provides free medical consultation of specialists in different medical areas, allowing for the correct patient diagnosis and follow-up. The specialist determines whether the patient is a candidate to use Transferon®, the appropriate dose, and considers the greater benefit for the patient in all cases.

This drug has been largely used in our country; however, there is an information gap regarding its function and

provenientes de humanos en México. En años recientes, su trabajo se completó con el registro de patente de un proceso de fabricación a escala industrial, lo que ha permitido su protección industrial en Estados Unidos de América, México, Colombia y recientemente en la Unión Europea.

El Transferon® es un producto hemoderivado con propiedades inmunomodulatorias, está compuesto por una mezcla de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) provenientes de la ruptura de leucocitos humanos. Se considera que es un fármaco complejo y que tiene atributos de calidad reproducibles lote a lote.

La producción de Transferon® se realiza bajo estrictos estándares de calidad que resultan en un proceso de fabricación robusto. La liberación de lotes de Transferon® se realiza con base en el cumplimiento de una especificación de calidad, la cual se sustenta en la caracterización fisicoquímica y funcional del producto.

Más de 15,000 pacientes al año se benefician con el uso de Transferon®, el cual ha demostrado ser efectivo como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades como la alergia, autoinmunidad e infecciones. Este tipo de patologías involucran una falla o una desregulación del sistema inmunológico, de ahí la importancia de la capacidad inmunomoduladora de Transferon®, la cual se ha demostrado en ensayos *in vitro* y en modelos animales.

También se debe de considerar que el uso de Transferon® ha demostrado ser seguro y actualmente cuenta con un proceso de farmacovigilancia que ha permitido darle seguimiento al producto desde hace 8 años, periodo en el cual no se han registrado eventos adversos graves. Asimismo, la UDIMEB¹, a través de USEIC², brinda un servicio de consulta médica gratuita, proporcionada por médicos especialistas de diferentes disciplinas médicas, lo que permite un adecuado diagnóstico y seguimiento del paciente. El médico especialista determina si el paciente es candidato para el uso de Transferon®, la dosis adecuada para el padecimiento, y en todos los casos considera el mayor beneficio para el paciente.

Este producto tiene una amplia historia de uso en nuestro país, sin embargo, ha existido un vacío de información sobre su funcionamiento y sus efectos. Es sólo hasta fechas recientes que la UDIMEB se ha comprometido con un riguroso análisis

¹UDIMEB. Unidad de Investigación, Desarrollo e Innovación Médica y Biotecnológica.

²USEIC. Unidad de Servicios Externos e Investigación Clínica.

¹UDIMEB. Unidad de Investigación, Desarrollo e Innovación Médica y Biotecnológica.

²USEIC. Unidad de Servicios Externos e Investigación Clínica.

effects. Recently, UDIMEB has committed to a rigorous molecular and clinical analysis of the product. Therefore, we consider that spreading this knowledge is essential to a better use of the product by the general population. Additionally, the implemented strategy can be useful for the development of other products or extracts with similar or different therapeutic properties to Transferon®. In this document, we present the current scientific information of the characteristics and effects of Transferon® after years of research by several scientific groups of renowned institutions in our country.

Physicochemical characterization

The physicochemical characterization of a complex drug is not only useful to determine its properties, but also is fundamental to establish its attributes based on batch-to-batch reproducibility (Nicholas, 2012). Transferon® has been analyzed by different chromatographic, electrophoretic, and spectroscopic techniques, which allowed to define and control its content (total peptides), assess its identity and peptide origin, and identify its most relevant batch-to-batch consistent physicochemical characteristics. This is especially important since the characteristics of a complex drug entirely depend on the manufacturing process and slight alterations to the process will generate drugs with different safety, quality, and efficacy (De Stefano et al., 2009). Furthermore, all the physicochemical and biological properties of Transferon® depend on a standardized manufacturing process that is intellectually protected in USA, EU, and Mexico (Estrada-Parra et al., 2013, 2016); and they cannot be directly extrapolated to other dialyzable extracts since each product might have different components when obtained through different manufacturing processes, thus they must be independently evaluated.

Total peptide content

Historically, the concentration of DLE of peripheral blood, spleen, or other sources and species have been defined based on their biological activity. This process uses arbitrary units defined as the total mass of peptides obtained from the lysis process of a defined number of leukocytes (Jose et al., 1976). However, the magnitude of these units varies among products since the lysis efficiency is also different among processes. In order to control the variability of the biological activity in each batch, and the expected therapeutic effect, the concentration of Transferon®

molecular y clínico sobre este producto. Es por ello que consideramos esencial la divulgación de este conocimiento para un mejor uso del producto por parte de la población general. Así mismo, la estrategia implementada puede ser útil para el desarrollo de otros productos o extractos con propiedades terapéuticas similares o diferentes a Transferon®. En este documento se presenta la información científica actual de las características y los efectos de Transferon® resultado de años de investigación de diversos grupos de científicos de prestigiosas instituciones de nuestro país.

Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de un medicamento complejo, además de determinar sus propiedades, es fundamental para el establecimiento de sus atributos, con base en la reproducibilidad entre lotes (Nicholas, 2012). Transferon® ha sido analizado por distintas técnicas cromatográficas, electroforéticas, y espectroscópicas, las cuales han permitido definir y controlar su contenido (péptidos totales), determinar su identidad y origen peptídico, así como identificar sus características fisicoquímicas más relevantes y reproducibles en distintos lotes. Esto debe destacarse debido a que las características de un fármaco complejo dependen totalmente del proceso de fabricación, y ligeras modificaciones a este proceso generarán productos con características de seguridad, calidad y eficacia probablemente diferentes (De Stefano et al., 2009). En este sentido, todas las propiedades fisicoquímicas y biológicas de Transferon® dependen de un método de fabricación estandarizado y protegido intelectualmente en los Estados Unidos de América, la Comunidad Europea y México (Estrada-Parra et al., 2013, 2016) y no pueden ser extrapoladas de forma directa a otros extractos dializables, ya que cada producto, al obtenerse por diferentes procesos de fabricación, puede presentar diferentes componentes y por lo tanto deben ser evaluados de forma independiente.

Contenido total de péptidos

Históricamente, la concentración de los extractos dializables de leucocitos de sangre periférica, esplénicos o de otra fuente y especie, fue definida con base en su actividad biológica empleando unidades arbitrarias, que se definen como la cantidad de masa peptídica obtenida de la lisis de un número definido de leucocitos (Jose et al., 1976). Sin embargo, la magnitud de estas unidades varía de un producto a otro debido a que no se considera que la eficiencia de la lisis difiere entre los procesos empleados. Para controlar la variabilidad de la actividad biológica de cada lote, y el efecto terapéutico esperado, la concentración

was defined based on the total peptide content (0.4 mg/mL) (Medina-Rivero *et al.*, 2014).

Mass distribution profile

All drugs must have an identity test that differentiate them from other drugs. Complex drugs, in specific, must account for analytical tests that demonstrate the dispersion of all its components. In this sense, the identity test of Transferon® is based on the analysis of its components' mass distribution. The identity profile of Transferon®, obtained through size exclusion chromatography, is composed of eight main populations with molecular weight under 10 kDa (Medina-Rivero *et al.*, 2014). This profile has been fundamental to the quality control of Transferon® and to develop comparability studies against other dialyzable extracts.

Peptide characterization

The characterization of Transferon® has focused on its most abundant fraction, peptides. Therefore, the used techniques analyze the characteristics of these biopolymers: size, the proportion of amino acids, and consistency of peptide polarity. These studies have proven that Transferon® peptides have a molecular weight lower than 10 kDa, are mostly hydrophilic, and have glycine as the most abundant amino acid. These properties are batch-to-batch reproducible (Medina-Rivero *et al.*, 2016). Recently, the polydispersity index was determined at 1.11 orthogonally using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. This proves the applicability of high-technology techniques for a characterization that will allow identifying the sequence of the active peptide components in this complex drug (Vázquez-Leyva *et al.*, 2019).

Effects of Transferon® in different *in vitro* models

Given the high molecular complexity of Transferon®, it is expected to find diverse *in vitro* effects related to its immunomodulatory properties, which also depend on the model employed, the use of concomitant stimuli, and the concentration of Transferon®.

One of the used models to evaluate the effects of Transferon® consisted on the use of THP-1 cell line which is derived from human monocytes. Cells were differentiated into macrophages (CD11b⁺ and CD14⁺) stimulated with LPS and low and high doses of

de Transferon® se definió con base en el contenido de péptidos totales (0.4 mg/mL) (Medina-Rivero *et al.*, 2014).

Perfil de distribución de masa

Todos los fármacos deben de contar con una prueba que los identifique de cualquier otro. De forma particular, para los fármacos complejos se requiere una prueba que muestre la dispersión de todos sus componentes. En este sentido, la prueba de identidad de Transferon® se basa en el análisis de la distribución de la masa de sus componentes. El perfil de identidad de Transferon®, obtenido por cromatografía de exclusión de tamaño molecular, está compuesto por 8 poblaciones principales con pesos moleculares menores a 10 kDa (Medina-Rivero *et al.*, 2014). Este perfil ha sido fundamental para el control de calidad de Transferon® así como para desarrollar estudios de comparabilidad con otros extractos dializables.

Caracterización peptídica

La caracterización de Transferon® se ha centrado en su fracción más abundante, los péptidos. Es por ello por lo que las técnicas empleadas analizan las características de estos biopolímeros: tamaño, así como proporción de aminoácidos y consistencia de la polaridad peptídica. Estos estudios han mostrado que los péptidos de Transferon® tienen un peso molecular menor a 10 kDa, son principalmente hidrofílicos y que el aminoácido más abundante es la glicina; estas propiedades son reproducibles entre lotes (Medina-Rivero *et al.*, 2016). Recientemente, se logró determinar el índice de polidispersión en 1.11 de forma ortogonal empleando espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, lo que demuestra la aplicabilidad de técnicas de última generación para una caracterización que permita identificar la secuencia de los componentes peptídicos activos de este fármaco complejo (Vázquez-Leyva *et al.*, 2019).

Efectos de Transferon® en diferentes modelos *in vitro*

Debido a la gran complejidad molecular de Transferon®, resulta hasta cierto punto lógico encontrar diversos efectos *in vitro* relacionados con sus propiedades inmunomoduladoras, estas dependen también del modelo empleado, de la aplicación de estímulos concomitantes y de la concentración de Transferon®. Uno de los modelos empleados para evaluar los efectos de Transferon® consistió en el uso de las células THP-1, provenientes de monocitos humanos, estas se diferenciaron hacia células macrofágicas (CD11b⁺ y CD14⁺), que se estimularon tanto con LPS como con dosis altas y bajas

Transferon®. No changes in IL-1 β , TNF- α , and IL-6 levels were observed under the experimental conditions tested when stimulated only with the drug (10 pg/mL–10 μ /mL). Conversely, significant differences were observed in the expression of costimulatory CD80 and CD86 molecules and in the production of IL-6 when THP-1 macrophages were treated with LPS (1 μ g/mL) and high doses of Transferon® (0.1–10 μ g/mL). Although the only detected correlation was the expression of CD80 (obtained while stimulating with 10 μ g/mL Transferon® and LPS) and IL-6. This result suggests a positive feedback between IL-6 production and the expression of CD80, as reported in other cell populations (Jiménez-Urbe et al., 2019).

Another system used in the evaluation of the immunomodulatory effects of Transferon® is the Jurkat cell line which is derived from human T lymphocytes. In which the levels of IFN- γ produced when treated with Transferon® were analyzed. A discrete production of the cytokine was observed, which allowed the development of a limit test for batch release (Medina-Rivero et al., 2014). Later, research continued until obtaining a test that not only considered the concentration limits of an inflammatory molecule but had a dose-response behavior, and complied with the pharmaceutical industry standards. The test had to meet all the validation parameters of any bioassay used for batch release, such as concentration interval, precision, accuracy, specificity, and system suitability. This was achieved by adding different concentrations of the drug to “rescue” cells from proliferation inhibition induced by azathioprine, a purine analog that interferes with DNA replication. This methodology allows for the replacement of less sensitive and costly methodologies and can be routinely applied for batch release purposes (Carballo-Uicab et al., 2019).

Another study uses an elegant model to induce a specific type of NK CD56⁺CD16⁺CD11c⁺ cells produced by treatment with Transferon® from progenitor cells (CD34⁺) obtained from human umbilical cord. It was observed that the resulting cell population showed distinctive characteristics of NK cells, such as IFN- γ production and cytotoxicity to tumor cells, as well as to induce the proliferation of T γ δ lymphocytes. It is suggested that Transferon® exerts a direct effect *in vitro* on progenitor cells (CD34⁺) as well as the activation and remodeling of the support hematopoietic microenvironment (Ramírez-

de Transferon®. Bajo las condiciones experimentales probadas, no se observaron cambios en los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-6 cuando se estimulaba únicamente con el medicamento (10 pg/mL-10 μ g/mL). En cambio, se observaron diferencias significativas en la expresión de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 así como en la producción de IL-6 cuando los macrófagos THP-1 se trataron con LPS (1 μ g/mL) y dosis altas de Transferon® (0.1 μ g/mL-10 μ g/mL). Aunque la única correlación detectada fue entre la expresión de la molécula CD80 (obtenida cuando se estimulaba con Transferon® a 10 μ g/mL más LPS) con la IL-6. Lo anterior sugiere una posible retroalimentación positiva de la producción de IL-6 sobre la expresión de CD80 como se ha reportado con otras extirpes celulares (Jiménez-Urbe et al., 2019).

Otro sistema que se ha empleado para la evaluación de los efectos inmunomoduladores de Transferon® es el uso de la línea celular Jurkat proveniente de linfocitos T humanos, en las que se analizaron los niveles de IFN- γ producidos cuando estas se trataron con el Transferon®, observándose la producción discreta de esta citocina, lo que incluso permitió desarrollar una prueba límite de liberación de lotes (Medina-Rivero et al., 2014). Más adelante se continuó con la investigación a este respecto para poder contar con una prueba que no sólo considerara los límites de la concentración de una molécula inflamatoria sino que tuviera un comportamiento dosis-respuesta que cumpliera con los estándares de la industria farmacéutica, esto es, que pasara todos los parámetros de validación de cualquier bioensayo que se ocupe para la liberación de lotes, como lo son: intervalo de concentración, precisión, exactitud, especificidad y adecuabilidad del sistema. Lo anterior se logró adicionando diferentes concentraciones del medicamento, resultando en un “rescate” de las células de la inhibición de la proliferación inducida por la azatioprina, un análogo de las purinas, la cual interfiere con la replicación de DNA. Esta metodología es de utilidad pues permitirá el reemplazo de metodologías menos sensibles y costosas para efectuarse rutinariamente para la liberación de lotes (Carballo-Uicab et al., 2019).

En otro estudio que emplea un modelo elegante de inducción de un tipo particular de células NK CD56⁺CD16⁺CD11c⁺ producidas por tratamiento con el Transferon® a partir de células progenitoras (CD34⁺) obtenidas de cordón umbilical humano. Se observó que la población celular resultante poseía características distintivas de células NK tales como la producción de IFN- γ y la citotoxicidad hacia células tumorales, así como la inducción la proliferación de linfocitos T γ δ . Esto sugiere que Transferon® tiene un efecto directo *in vitro* sobre las células progenitoras (CD34⁺) así como la activación y

Ramírez *et al.*, 2016). The models described contribute with knowledge of the pharmacodynamic of the product by proving immunomodulatory and stimulation effects of early hematopoiesis.

Safety and efficacy tests of Transferon® in animal models

There are four relevant studies in animals that comprise the establishment of a test for batch release to the production of support information on safety and clinical use of Transferon®. The first study was conducted by Salinas-Jazmín and colleagues (Salinas-Jazmín *et al.*, 2015), who developed a murine model of infection with *Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1, strain KOS). The virus can induce a neuropathic effect in mice, clinically expressed as reduced motility, paralysis, weight loss, and death. Mice were administered with different doses of Transferon® orally at an interval from 12.5 ng to 1.50 µg every other day for 10 days and were continuously followed-up for 20 days to observe the development of clinical signs. During the study, serum levels of proinflammatory cytokines were evaluated. The results of the study demonstrated that the treatment with Transferon® increased the survival of infected mice with respect to controls. In addition, Transferon® was observed to increase IFN-γ concentration, which suggests that it indirectly stimulates the activation of HSV-1-specific T lymphocytes. This proves that the protective effect of this drug is mediated by its activity on the immune system.

Another study conducted by Hernández-Esquivel and colleagues (Hernández-Esquivel *et al.*, 2018) developed a xenotransplantation model of transformed murine prostate epithelial cells (PEC-Src), representing the transcriptional profiles of human prostate cancer. These cells can be tracked through bioluminescence in an *in vivo* imaging system Lumina XR (Caliper Life Sciences). Cells were injected in mice to induce metastasis and tumors. Animals were then administered with different doses of Transferon® (1–25 µg/kg). Results showed a dose-dependent effect of Transferon® to reduce tumoral growth and metastasis in the brain. The study concluded that, despite Transferon® does not have direct cytotoxic or antitumoral effects, it can regulate the production of proinflammatory cytokines and several growth factors that inhibit tumor growth. These results make evident the potential uses of Transferon® in this type of human cancer.

remodelamiento del microambiente hematopoyético de soporte (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2016). Los modelos descritos aportan al conocimiento de la farmacodinamia del producto al demostrar efectos inmunomoduladores y de estimulación de hematopoyesis temprana.

Estudios de seguridad y eficacia de Transferon® en modelos animales

Existen cuatro estudios relevantes en modelos animales que comprenden el establecimiento de una prueba para liberación de lotes hasta la generación de información de soporte de la seguridad y usos clínicos de Transferon®. El primero de ellos fue conducido por Salinas-Jazmín y colaboradores (Salinas-Jazmín *et al.*, 2015) en el cual desarrolló un modelo murino de infección con el virus *Herpes simplex* (HSV-1, cepa KOS). Este virus es capaz de inducir un efecto neuropático en los ratones que se manifiesta clínicamente con reducción de motilidad, parálisis, pérdida de peso y muerte. A los ratones se les administraron diferentes dosis de Transferon® por vía oral en un intervalo de 12.5 ng a 1.50 µg cada tercer día durante 10 días y se les dio seguimiento durante 20 días para observar el desarrollo de los signos clínicos. Durante el estudio se evaluaron los niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias. Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con el Transferon® incrementó la sobrevivencia de los ratones infectados, con respecto a los controles. Además, se observó que Transferon® incrementó la concentración de IFN-γ, lo que sugiere que estimula indirectamente la activación de linfocitos T específicos para HSV-1. Esto muestra que el efecto protector de este fármaco está mediado por su actividad sobre el sistema inmunológico.

En otro estudio conducido por Hernández-Esquivel y colaboradores (Hernández-Esquivel *et al.*, 2018) se desarrolló un modelo murino de xenotransplante de células epiteliales de próstata murinas transformadas (PEC-Src) que representan los perfiles transcripcionales de cáncer de próstata en humanos. Estas células se pueden seguir *in vivo* mediante un sistema de bioluminiscencia en el sistema IVIS XR (Caliper Life Sciences). Las células se inyectaron en los ratones para inducir metástasis y desarrollo de tumores, y posteriormente se les administraron diferentes dosis de Transferon® (1 a 25 µg/kg). Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente en la capacidad de Transferon® para reducir el crecimiento tumoral y la metástasis a cerebro. En el estudio se concluye que, aunque Transferon® no tiene un efecto citotóxico o antitumoral directo, sí es capaz de regular la producción de citocinas pro-inflamatorias y diversos factores de crecimiento que pueden inhibir el crecimiento tumoral.

Immunogenicity is another factor to be considered when protein or protein-derived drugs are used. At this regard, there are two important works on Transferon®. The first was conducted by Ávila and colleagues (Ávila et al., 2017) to evaluate the immunogenicity of Transferon® combined with adjuvants. Mice were immunized at days 1, 7, and 14; ovalbumin was used as positive control and hydrolyzed collagen as negative control. The results proved that, although Transferon® and the controls increased total IgGs serum levels, only ovalbumin was able to induce the production of specific antibodies. Therefore, the study concluded that Transferon® is not immunogenic. In a study conducted by Mellado-Sánchez and colleagues (Mellado-Sánchez et al., 2019), Transferon® was covalently conjugated to carrier proteins, as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA), to increase its immunogenic potential. Mice and rabbits immunized with the conjugates showed a significant production of antibodies able to recognize Transferon® components. Additionally, rabbits exhibited higher titration with respect to mice and their antibodies blocked IL-2 production in Jurkat cells after costimulation with Transferon®.

Collectively, these studies demonstrated that Transferon® is capable to induce a biological response in animal models not by a direct effect against the etiological agent, but through the modulation of the immune response. Besides, it was found that Transferon® has a low immunogenic potential on its own.

Clinical research

Although scarce, clinical research have revealed significant data, among which are the adverse effects induced by Transferon® consumption (Homberg et al., 2015). The effects were evaluated in 3844 patients with different conditions, such as arthritis, allergies, and infections, all of them treated canonically and using Transferon® as a therapeutic adjuvant. The adverse effects commonly reported were headache, increase in symptomatology of the main clinical condition, rhinorrhea, cough, fatigue, and rash. All of them were exhibited by 0.01 % of the participants and, interestingly, were more frequent in women, thyroid-hormone or estrogen consumers, and subjects in glucocorticoid therapy.

This finding is relevant considering the data published on major depressive disorder patients treated with

Estos resultados dejan la puerta abierta a futuras investigaciones de los usos potenciales de Transferon® en este tipo de cáncer en humanos. Un aspecto importante para considerar, cuando se utilizan medicamentos proteínicos o derivados de proteínas, es su potencial inmunogenicidad. Al respecto, existen dos trabajos relevantes en Transferon®. El primero fue conducido por Ávila y colaboradores (Ávila et al., 2017) para evaluar la inmunogenicidad de Transferon® combinado con diversos coadyuvantes, en este estudio se inmunizaron ratones a los días 1, 7 y 14; se utilizó ovoalbúmina como control positivo y colágeno hidrolizado como control negativo. Los resultados del estudio demostraron que si bien Transferon® y los controles incrementaron los niveles séricos de IgGs totales, sólo la ovoalbúmina fue capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos. Por lo que se concluyó que Transferon® no es inmunogénico. Posteriormente, en un estudio conducido por Mellado-Sánchez y colaboradores (Mellado-Sánchez et al., 2019), Transferon® se modificó químicamente para unirse de forma covalente con proteínas acarreadoras, como hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina sérica bovina (BSA), con el fin incrementar su potencial inmunogénico. En este estudio se inmunizaron ratones y conejos, y se observó que los animales inmunizados con los conjugados mostraron una producción significativa de anticuerpos capaces de reconocer a los componentes de Transferon®. Además los conejos mostraron títulos más altos con respecto a los ratones y sus anticuerpos fueron capaces de bloquear la producción de IL-2 en células Jurkat después de la coestimulación con Transferon®.

En conjunto, estos estudios demostraron que Transferon® es capaz de inducir una respuesta biológica en modelos animales, si bien, no por un efecto directo contra el agente etiológico, si mediante la modulación de la respuesta inmunológica. Así mismo, se observó que Transferon® por si sólo tiene un bajo potencial inmunogénico.

Investigación Clínica

La investigación clínica, aunque pequeña en número, ha revelado datos muy significativos, entre ellos los efectos adversos inducidos por el consumo de Transferon® (Homberg et al., 2015), los cuales fueron evaluados en 3844 pacientes con diferentes padecimientos como artritis, alergia e infecciones, todos ellos tratados de forma canónica y usando Transferon® como adyuvante terapéutico, los eventos adversos comúnmente reportado fueron dolor de cabeza, incremento de la sintomatología del cuadro clínico principal, rinorrea, tos, fatiga y “rash cutáneo”, todos ellos se presentaron en el 0.01 % de participantes e interesantemente fueron más frecuentes en mujeres y consumidores de hormonas tiroideas o estrógenos así como de terapia con glucocorticoides.

serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and Transferon® (Hernández *et al.*, 2013). This work proved that the biggest difference between depressive patients treated with SSRI antidepressants and those treated with SSRIs + Transferon® is a 50 % reduction of cortisol levels from week 20 of a 52-week treatment. Contrastingly, the canonical treatment with SSRIs only reached a 30 % decrease in cortisol levels at week 52. It must be noted that the decrease in circulating cortisol levels is considered a marker of clinical improvement since it indicates a decrease in hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis characteristic of this disease.

Furthermore, patients treated with SSRIs + Transferon® *versus* SSRIs show higher circulatory IFN- γ levels than those induced by SSRIs consumption from week 5 until the end of the study. Circulatory IFN- γ levels are directly related to the number of neuronal connections of the brain regions involved with social behaviors (Filiano *et al.*, 2016).

Finally, a recently published study consisted of a follow-up from January 2010 to December 2016 and evaluated 123 pediatric patients with sepsis; 15 of them were treated with standard medication and Transferon® while 108 received canonical treatment (Castrejón *et al.*, 2019). When compared against the control group, patients treated with Transferon® showed decreased levels of C reactive protein, increased leukocyte count, and reduced levels of neutrophils in the first 72 h after hospitalization. In addition, those patients treated with Transferon® showed a higher rate of survival. This supports the relevance of safety and the immunomodulatory ability of the inflammatory response. Indeed, the drug has positive effects as a therapeutic adjuvant in pathologies with a considerable inflammatory component.

Conclusions

Transferon® is a safe and effective product of high quality. Its quality is supported by an extensive physicochemical characterization which confirms that the manufacturing process is robust and yields consistent batches. On the other hand, the safety of this drug has been proven through immunogenicity

Este hallazgo se vuelve relevante a la luz de los datos publicados en pacientes con depresión mayor tratados con SSRIs (Inhibidores de la recaptura de serotonina) y Transferon® (Hernández *et al.*, 2013). Este trabajo se muestra que la mayor diferencia entre los pacientes deprimidos tratados con antidepressivos de la familia de los SSRIs *versus* pacientes deprimidos tratados con SSRIs + Transferon® es la disminución de un 50 % de los niveles de cortisol desde la semana 20 de 52 de tratamiento en tanto que el tratamiento canónico con SSRIs sólo logra una disminución del 30 % en los niveles de cortisol hacia la semana 52. Es importante señalar que la disminución de los niveles circulantes de cortisol es reconocido como un marcador de mejoría clínica, ya que indica una disminución de la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales que caracteriza a esta enfermedad.

Adicionalmente y como un dato relevante, está el hecho de que los pacientes tratados con SSRIs + Transferon® *versus* SSRIs presentan niveles circulatorios mayores de IFN- γ que los que se induce por el consumo de los SSRIs desde la semana 5 y hasta el término del estudio. Los niveles circulatorios de IFN- γ están vinculados directamente con el número de conexiones neuronales de las regiones cerebrales involucradas con las conductas de socialización (Filiano *et al.*, 2016).

Por último, recientemente se ha publicado un estudio que abarca un seguimiento desde enero del 2010 hasta diciembre del 2016 y evalúa 123 pacientes pediátricos con sepsis (15 tratados con el medicamento estándar más Transferon® y 108 de forma canónica) (Castrejón *et al.*, 2019), los pacientes tratados con Transferon® en comparación con el grupo control presentaron una disminución de los niveles de proteína C reactiva, un incremento en la cuenta leucocitaria así como una disminución en la cuenta de neutrófilos, todo ello en las primeras 72 horas posteriores a la hospitalización, debiéndose destacar que el grupo de pacientes tratados con Transferon® presenta una mayor tasa de sobrevida. Lo anterior respalda el hecho de la seguridad y capacidad inmunomoduladora de la respuesta inflamatoria, donde se pueden observar efectos positivos del uso de este fármaco como adyuvante terapéutico en patologías con un importante componente inflamatorio.

Conclusiones

Transferon® es un producto seguro y eficaz de alta calidad. Su calidad está apoyada por una extensa caracterización fisicoquímica que confirma que el proceso de fabricación es robusto y produce lotes consistentes. Por otro lado, su seguridad ha sido comprobada con estudios de inmunogenicidad y un programa de farmacovigilancia activa.

studies and an active pharmacovigilance program. In addition, the published evidence suggests that Transferon® is beneficial as an adjuvant treatment of conditions in which the inflammatory response is deregulated since it promotes the patient's recovery. Therefore, Transferon® can be considered as another therapeutic tool. Clearly, more studies should be conducted in upcoming years to improve the conditions of use of Transferon®.

Adicionalmente, la evidencia publicada sugiere que el uso de Transferon® como tratamiento coadyuvante de padecimientos donde la respuesta inflamatoria se encuentra desregulada es benéfico, ya que favorece un restablecimiento del paciente. Por lo tanto, Transferon® puede ser considerado una herramienta terapéutica más, para la comunidad médica. Sin lugar a dudas, más estudios deberán realizarse en las décadas por venir para mejorar las condiciones de uso de Transferon®.

References

- Avila S., Muñoz-García L., Vázquez-Leyva S., Salinas Jazmin N., Medina Rivero E. and Pavon L. (2017) Transferon™, a peptide mixture with immunomodulatory properties is not immunogenic when administered with various adjuvants. *Journal Immunotoxicology* 14: 169–177. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1346009>
- Carballo-Uicab G., Linares-Trejo J.E., Mellado-Sánchez G., Lopez Morales C. A., Velasco Velazquez M., Pavon L., Estrada Parra S., Perez Tapia S. M. and Medina Rivero E. (2019) Validation of a Cell Proliferation Assay to Assess the Potency of a Dialyzable Leukocyte Extract Intended for Batch Release. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24193426>
- Castrejón Vázquez M.I., Reséndiz-Albor A.A., Ynga-Durand M.A., Arciniega Martinez I. M., Orellano Villazon V. I., Gacia Lopez C. A., Laue Noguera M. L. and Vargas Camaño M. E. (2019) Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon™) Administration in Sepsis: Experience from a Single Referral Pediatric Intensive Care Unit. *Biomed Research International* 2019: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/8980506>
- De Stefano N., Filippi M. and Confavreux C. (2009) The results of two multicenter, open-label studies assessing efficacy, tolerability and safety of protiramer, a high molecular weight synthetic copolymeric mixture, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 15: 238–243. <https://doi.org/10.1177/1352458508098269>
- Estrada-Parra S., Estrada-García I. and Pérez-Tapia S.M. (2016) Method for obtaining a dialyzable leukocyte extract. 1:1–8
- Estrada-Parra S., Estrada-García I. and Pérez-Tapia S.M. (2013) Método de obtención de extracto dializable de leucocitos. 1–25.
- Filiano A.J., Xu Y., Tustison N.J., Marsh R. L., Baker W., Overall C. C., Gadani S. P., Turner S. D., Weng Z. Najamussahar Peerzade S., Chen H., Lee K. S., Scott M. M., Beenhakker M. P., Litvak V. and Kipnis J. (2016) Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535: 425–429. <https://doi.org/10.1038/nature18626>
- Hernández-Esquivel M.A., Pérez-Torres A., Romero-Romero L., Reyes Matute A., Loaiza B., Mellado Sanchez G., Pavon L., Medina Rivero E., Pastell R. G., Perez Tapia S. M. and Velasco Velazquez A. (2018). The dialyzable leukocyte extract Transferon™ inhibits tumor growth and brain metastasis in a murine model of prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101: 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.012>
- Hernandez M.E., Mendieta D., Pérez-Tapia M., Bojalil R., Estrada Garcia I., Estrada Perez S. and Pavon L. (2013) Effect of selective serotonin reuptake inhibitors and immunomodulator on cytokines levels: an alternative therapy for patients with major depressive disorder. *Clinical and experimental Immunomodulation* 2013: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/267871>
- Homberg T., Sáenz V., Galicia-Carreón J., Lara I., Cervantes Trujano E., Andaluz M. C., Vera E., Pineda O., Ayala Balboa J., Estrada García A., Estrada Parra S., Perez Tapia M. and Jimenez Martinez M. C. (2015) The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferon™ (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report. *Pharmacol & Pharm* 06: 65–74. <https://doi.org/10.4236/pp.2015.62009>
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal* 11: 3887–95. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>

- Jiménez-Urbe A.P., Valencia-Martínez H., Carballo-Uicab G., Vallejo Castillo L., Medina Riveo E., Chacon Salinas R., Pavon L., Velasco Velazquez M.A. Mellado Sanchez G., Estrada Parra S. and Perez Tapia S.M. (2019) CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *Journal of Immunology Research* 2019: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/2198508>
- Jose D., Ford G. and Welch J. (1976) Therapy with parent's lymphocyte transfer factor in children with infection and malnutrition. *The Lancet* 307: 263–266. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91399-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91399-4)
- Leach D.R., Krummel M.F. and Allison J.P. (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734–6. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- Medina-Rivero E., Merchand-Reyes G., Pavón L., Vazquez Leyva S., Perez Sanchez G., Salinas Jizmin N. Estrada Parra S., Velasco Velazquez M. and Perez Tapia M. (2014) Batch-to-batch reproducibility of Transferon™. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 88: 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.09.004>
- Medina-Rivero E., Vallejo-Castillo L., Vázquez-Leyva S., Perez Sanchez G., Favari L., Velasco Velazquez M., Estrada Parra S. Pavon L. and Perez Tapia S. M. (2016) Physicochemical Characteristics of Transferon™ Batches. *Biomed Res Int* 2016: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7935181>
- Mellado-Sánchez G., Lázaro-Rodríguez J.J., Avila S., Vallejo Castillo L., Vazquez Leyva S., Carballo Uicab G., Velasco Velezquez M., Medina Rivero E., Pavon L., Chacon Salinas R. and Perez Tapia S. M. (2019) Development of Functional Antibodies Directed to Human Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *Journal Immunology Research* 2019: 2754920. <https://doi.org/10.1155/2019/2754920>
- Nicholas J.M. (2012) Complex Drugs and Biologics: Scientific and Regulatory Challenges for Follow-on Products. *Journal Indexing and Metrics*, 46: 197–206. <https://doi.org/10.1177/0092861512437759>
- Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N. and Honjo T. (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11: 141–51. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80089-8)
- Ramírez-Ramírez D., Vadillo E., Arriaga-Pizano L.A., Mayani H., Estrada Parra S., Velasco Vazquez M. A., Perez Tapia S. M. and Pelayo R. (2016) Early Differentiation of Human CD11c+NK Cells with $\gamma\delta$ T Cell Activation Properties Is Promoted by Dialyzable Leukocyte Extracts. *Journal of Immunology Research*, 2016: 4097642. <https://doi.org/10.1155/2016/4097642>
- Salinas-Jazmín N., Estrada-Parra S., Becerril-García M.A., Limon Flores A. Y., Vazquez Leyva S., Medina Rivero E., Pavon L. Velasco Velzquez A. and Perez Tapia S. M. (2015) Herpes murine model as a biological assay to test dialyzable leukocyte extracts activity. *Journal of Immunology Research*, 2015: 146305. <https://doi.org/10.1155/2015/146305>
- Vázquez-Leyva S., Vallejo-Castillo L., Lopez Morales C. A., Herbert Pucheta J. E., Zepeda Vallejo L.G. Velasco Velazquez M. Pavon L., Perez Tapia S. M. and Medina Rivero E. (2019) Identity Profiling of Complex Mixtures of Peptide Products by Structural and Mass Mobility Orthogonal Analysis. *Anal Chem* 91: 14392–14400. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02873>
- Yang Y (2015) Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *The Journal of clinical Investigation* 125: 3335–7. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>