

DESARROLLO DE PROTOCOLOS INNOVATIVOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIVENENOS Y SU ENSAYO A ESCALA PILOTO, Y PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIVENENOS BASADOS EN LA METODOLOGÍA DE ANTICUERPOS IGY.

El presente TRABAJO tiene por finalidad desarrollar protocolos para la purificación de inmunoglobulinas de dos orígenes (equino y gallina) distintos para ser utilizadas como insumos en la elaboración de sueros antiponzoñosos.

Los protocolos propuestos serán puestos en práctica en el INPB-ANLIS-Malbrán bajo la supervisión del Dr. José Christian DOKMETJIAN. Una vez desarrollados los protocolos, se remitirán al área de I+D+i en Vacunas (Dr. Matías FINGERMANN) para ser ensayados a escala de laboratorio, y se procederá al escalado hasta llegar a escala piloto.

Las inmunoglobulinas antiveneno a purificar serán las provenientes de 1) caballos hiperinmunizados(a partir del plasma de los mismos) y de 2) gallinas hiperinmunizadas (a partir de huevos).

1.- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIVENENO A PARTIR DE PLASMA DE CABALLOS HIPERINMUNIZADOS

En este ítem se pretende reemplazar la técnica actual de precipitación con sulfato de amonio, que es laboriosa y de bajo rendimiento por la de precipitación con ácido caprílico, que posee reconocidas ventajas.

OBJETIVOS GENERALES

El principal recurso terapéutico contra el envenenamiento por mordeduras de serpientes es el antiveneno obtenido a partir de plasma hiperinmune de caballos, consistente en anticuerpos IgG enteros o sus fragmentos (Fab')₂ (Morais y Massaldi, 2009). Dichos antivenenos se producen desde hace 100 años con muy pocas modificaciones a través del tiempo. Este trabajo pretende incursionar en este tema proponiendo la optimización de nuevas tecnologías para mejorar el rendimiento y con ello disminuir el costo de elaboración.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que en el Instituto Nacional de Producción de Biológicos se producen sueros antiveneno de serpientes, arañas y escorpiones por métodos que a través del tiempo no han sufrido modificaciones sustanciales y por lo tanto adolecen de bajos rendimientos y consecuentemente altos costos, este Proyecto propone cambiar la metodología de precipitación con sulfato de amonio por el tratamiento con ácido caprílico, en condiciones optimizadas por experimentos de diseño factorial para la producción de fragmentos (Fab')₂ y con ello abastecer al país llegando a más lugares del mismo y posiblemente a la región.

RELEVANCIA DEL PROBLEMA

El uso de anticuerpos IgG enteros ha sido cuestionado, argumentando que su fragmentoFc es el principal responsable de las reacciones adversas tempranas asociadas con la administración intravenosa de estos antivenenos (Chippaux, 1998), como consecuencia de la activación del complemento. Teniendo en cuenta este argumento, en algunos países los antivenenos se preparan por digestión de los anticuerpos IgG con pepsina para obtener los fragmentos (Fab')₂. Por otro lado, la administración de IgG entera es sostenida por otros autores (Otero y col., 1999), quienes sostienen que los principales responsables de las reacciones adversas son los agregados proteicos, las proteínas contaminantes y la carga proteica inyectada.

El Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB, ANLIS Malbrán) es el principal productor de sueros antiponzoñosos de la Argentina, generando antivenenos contra mordeduras de serpientes y de arañas, y picadura de escorpiones. El proceso de producción empleado consiste en una doble precipitación con sulfato de amonio y ultrafiltración, proceso que se ha utilizado desde su implementación hace por lo menos 40 años. Esta metodología, si bien provee un antiveneno de buena calidad, es trabajosa y el rendimiento es relativamente bajo para un proceso biológico de esas características (alrededor del 30%). Si se tiene en cuenta que para obtener los plasmas hiperinmunes se utilizan caballos que deben ser mantenidos en las mejores condiciones sanitarias, se comprende que un aumento del rendimiento del proceso de preparación de los sueros antivenenos redundaría en una menor cantidad de caballos a utilizar y por lo tanto un menor costo de producción. Con este objetivo, hay 2 caminos que pueden ser explorados: i) Mejorar el proceso actual de precipitación con sulfato de amonio, o ii) Ensayar métodos alternativos de mejor performance y costo.

Varios métodos han sido desarrollados para la producción de antivenenos. Las técnicas cromatográficas como las de afinidad o intercambio iónico rinden un producto de alta calidad (Dias y col., 1989; Smith y col., 1992), pero el costo de producción es alto y requieren equipamiento especializado. Los métodos basados en la precipitación de IgG o (Fab')₂ con sulfato de amonio tienen bajo rendimiento y mayor posibilidad de formación de agregados.

La precipitación de proteínas no-inmunoglobulinas con ácido caprílico se conoce desde hace mucho tiempo (Steinbuch y Audran, 1969; McKinney y Parkinson, 1987; Perosa y col., 1990). En 1994, Rojas y col. aplicaron con éxito esta tecnología a la producción de antivenenos a partir de plasma hiperinmune de equinos. El proceso consiste en una única precipitación del plasma hiperinmune con ácido caprílico al 5%, obteniéndose un sobrenadante altamente enriquecido en IgG con alto rendimiento y actividad neutralizante de veneno. Como, a diferencia de la precipitación con sulfato de amonio, la IgG permanece soluble, la pérdida de rendimiento y la posibilidad de formación de agregados es menor. A bajo pH (4,7-5,0), la hidrofobicidad de la parte alifática del ácido caprílico se hace dominante y hace que las proteínas ácidas como la albúmina precipiten.

Los anticuerpos, por tener mayor pI, tienen suficiente carga para contrarrestar dicha hidrofobicidad y por lo tanto permanecen en el sobrenadante (Wang y col., 2009).

ANTECEDENTES EN LA MATERIA

Desde que la interacción hidrofóbica es la fuerza principal que interviene en la precipitación de la albúmina por el ácido caprílico, y dado que la temperatura tiene una importante influencia sobre este tipo de interacción, nuestro equipo de trabajo pudo demostrar una significativa mejora en el proceso de producción de antivenenos a base de IgG entera por la introducción del factor temperatura, conduciendo la precipitación a 37°C (Nudel y col., 2012). Con ello se logró un aumento en la velocidad de filtración para la separación del precipitado de albúmina y una menor cantidad de albúmina en el sobrenadante; además el proceso requiere una menor concentración de ácido caprílico, lo que redundará en un menor costo. Además, nuestro grupo de trabajo ha publicado una comparación entre la purificación de IgG enteras por el método de la precipitación con sulfato de amonio y el método de la precipitación de las proteínas no IgG con ácido caprílico, donde se muestra la ventaja del segundo método contra el primero (Ávila y col., 2013).

JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO

Si bien el proceso optimizado de precipitación con ácido caprílico para la obtención de antivenenos a base de IgG entera diseñado por nuestro grupo (Nudel y col., 2012) resulta enteramente satisfactorio, se ha suscitado una controversia respecto de las reacciones adversas, por lo que es de interés para el INPB contar con un proceso optimizado para la producción de antivenenos a base del fragmento (Fab')₂ obtenido por digestión con pepsina.

Por este camino se pretende un aumento del rendimiento y una disminución del costo del proceso de producción de los sueros antivenenos, sea a través del proceso en sí o en la disminución de la cantidad de plasma hiperinmune necesaria con la concomitante disminución del número de animales empleados.

El aumento de rendimiento, a su vez, permitirá aumentar la oferta de antivenenos para así poder llegar a más lugares del país de manera de acceder a más centros de salud para una reacción más rápida ante accidentes ponzoñosos y con ello aumentar las posibilidades de neutralización de los venenos.

Se procederá a la optimización del proceso a través de un análisis factorial tal como se llevó a cabo en la optimización de la precipitación de IgG entera (Nudel y col., 2012), teniendo en cuenta los factores que influyen en cada caso, tanto para el paso de precipitación como para el paso de clivaje enzimático.

El camino seguido por la mayoría de los procesos reportados en la literatura (Morais y col., 2014) es la digestión del plasma equino hiperinmune con pepsina y posterior precipitación de las moléculas no-(Fab')₂. Sin embargo, el análisis de los mismos revela diferencias en las condiciones utilizadas: dilución del plasma, pH, temperatura, tiempo de

incubación y concentración de pepsina o relación pepsina:proteína. Se han presentado algunos ensayos de optimización que no incluyen todos los factores que influyen en el clivaje con pepsina ni las interacciones entre estos factores:

- **Jones y Landon (2002)** presentan un método “optimizado” para la digestión de suero ovino hiperinmune consistente en un ajuste de pH a 3,5, agregado de pepsina en relación enzima:sustrato 1:50 e incubación a 37°C durante 14-18 h.
- **Morais y Massaldi (2005)** demuestran que el balance entre pH y tiempo de reacción es crítico, reflejando un compromiso entre el clivaje completo de las inmunoglobulinas y la desnaturalización de los fragmentos (Fab')₂.
- El método actualmente utilizado en el **INPB** prevé una dilución 1:3 del plasma equino hiperinmune, un ajuste de pH a 3,2, agregado de pepsina a razón de 8,5 g/l e incubación a 30°C durante 30 min.

Estos ejemplos indican que no hay un consenso en el ajuste de condiciones para la digestión con pepsina del plasma hiperinmune, por lo que cada fabricante utiliza procesos no optimizados que redundan en un menor rendimiento de fragmentos (Fab')₂, por lo que en este Proyecto se prevé la aplicación de un diseño factorial que permitirá la optimización de la etapa de digestión de las inmunoglobulinas. Un experimento factorial completo es un experimento cuyo diseño consta de dos o más factores, cada uno de los cuales con distintos valores o niveles, cuyas unidades experimentales cubren todas las posibles combinaciones de esos niveles en todos los factores. Este tipo de experimentos permite el estudio del efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable.

PLAN DE TRABAJO REQUERIDO

El diseño factorial será realizado según la técnica de Box y col. (2005), donde se estudiarán los efectos del pH, relación enzima:sustrato, temperatura y tiempo de incubación sobre el porcentaje de ruptura enzimática y la presencia de agregados proteicos en un ensayo factorial 2⁴. Cada variable se trabajará en 2 niveles.

Las respuestas a evaluar serán el % de ruptura enzimática y la presencia de agregados, en una tabla de 16 experimentos por duplicado. En un segundo round de diseño factorial se ajustarán los valores de las variables según los resultados del primer round, con lo que se logrará la optimización de la primera etapa del proceso de producción de antivenenos.

En este camino a explorar, la primera etapa corresponde a la precipitación de las moléculas no-IgG con ácido caprílico, de manera que en el sobrenadante quede IgG purificada para ser posteriormente digerida con pepsina. Las condiciones para esta primera etapa serán las descritas por nuestro grupo de trabajo (Nudel y col., 2012). Dichas condiciones son las siguientes: ácido caprílico 3%, pH 4,9, temperatura 37°C, sin dilución del plasma hiperinmune.

Una vez obtenido el sobrenadante conteniendo la IgG purificada, se procederá a la digestión con pepsina para obtener el fragmento (Fab')₂. Boushaba y col. (2003) reportaron

que la cinética de digestión con pepsina es más rápida con (Fab')₂ que con plasma total, de manera que las condiciones a seleccionar serán diferentes, obligando a un diseño factorial para la optimización del clivaje enzimático en condiciones más suaves. Se estudiarán los efectos del pH, relación enzima:sustrato, temperatura y tiempo de incubación sobre el porcentaje de ruptura enzimática y la presencia de agregados proteicos en un ensayo factorial 2⁴. Cada variable se trabajará en 2 niveles.

Una vez elegidos los parámetros optimizados se procederá a la diafiltración/ultrafiltración del sobrenadante con membrana de 30-50 kDa para cambiar el solvente a PBS y llevar la concentración de (Fab')₂ al valor adecuado para la formulación del antiveneno, se agregará fenol como conservador y se procederá a la filtración esterilizante final.

2.- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIVENENO A PARTIR DE YEMAS DE HUEVOS DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS

Como otra alternativa válida para el desarrollo de protocolos innovativos para la producción de sueros antiponzoñosos se estudiará la purificación de las inmunoglobulinas contenidas en la yema de huevos provenientes de gallinas hiperinmunizadas.

La inmunización de gallinas será realizada en instalaciones apropiadas del INPB o lugar a designar por el INPB, ello será ejecutado por personal especializado en esas tareas.

La primera extracción de las inmunoglobulinas se realizará mediante la partición en un buffer acuoso: la mayor parte de los lípidos estarán contenidos en la fase superior y las inmunoglobulinas se ubicarán en la fase inferior acuosa, acompañadas de diversos contaminantes que serán identificados por espectrometría de masas.

Debido a que la administración de sueros antiveneno es parenteral, el grado de pureza para los sueros de fuentes distintas del plasma de caballos inmunizados debe ser alto. Por lo tanto, la purificación es el paso crítico en su proceso de producción, lo que lleva a los productores a reconsiderar sus estrategias, buscando técnicas de purificación con mayores rendimientos y más económicas (Ladisch y col, 2001).

Todos los esquemas de purificación actuales consisten en varios pasos, que no permiten obtener el grado de pureza necesario.

La cromatografía de afinidad (AC) se basa en un reconocimiento molecular entre la proteína de interés y un ligando inmovilizado sobre un soporte. Ésta permite disminuir el número de pasos y maximizar la pureza y el rendimiento del proceso por lo que es considerado el método más eficiente para el aislamiento y purificación de proteínas en mezclas complejas (Roque y Lowe, 2007). Si bien los anticuerpos monoclonales (mAbs) son ligandos cromatográficos de alta afinidad y especificidad, su elevado costo dificulta su uso a nivel industrial. Por otro lado, los péptidos cortos son ideales como ligandos para separaciones

industriales por afinidad ya que pueden ser sintetizados a un costo muy inferior a los mAbs y en forma aséptica bajo normas GMP. Son mucho más estables porque no requieren de una estructura terciaria específica para mantener su actividad biológica y son fáciles de inmovilizar en las matrices cromatográficas con alto rendimiento. Las matrices con péptidos cortos inmovilizados tienen una larga vida útil ya que la unión del péptido al soporte cromatográfico es muy estable. Las interacciones entre los péptidos y las proteínas son generalmente moderadas, lo que resulta en condiciones suaves de elución (Huang y Carbonell, 1995).

El objetivo de la etapa de purificación es desarrollar una matriz cromatográfica de afinidad que por su carácter integrativo permita realizar el proceso de purificación de las IgY a partir del extracto deslipidizado hasta el nivel de pureza adecuado en solo un paso en lugar de la secuencia clásica de pasos cromatográficos basados en 3 propiedades de las biomoléculas: carga, tamaño e hidrofobicidad. De esta manera, el costo de la purificación podrá reducirse significativamente.

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON LIGANDOS PEPTÍDICOS

En el desarrollo de procesos de afinidad, es esencial la identificación de una estructura peptídica con suficiente selectividad y fuerza de unión como para llevar a cabo una separación por AC. El desarrollo de bibliotecas combinatorias peptídicas provee una técnica que permite ensayar decenas de millones de péptidos en forma empírica, lo que facilita enormemente el descubrimiento de ligandos adecuados para cualquier proteína de interés. En las bibliotecas peptídicas sintéticas, se sintetizan químicamente péptidos al azar sobre bolillas de un polímero soporte. Dentro de las diferentes estrategias de construcción de bibliotecas peptídicas en fase sólida, el método dividir-acoplar-recombinar (DAR) es el más conveniente (Furka y col., 1991; Lam y col., 1991). Éste se basa en (i) dividir el soporte sólido en porciones iguales equivalentes al número de aminoácidos que se utilizarán en la construcción de la biblioteca, (ii) acoplar en cada porción un aminoácido diferente y (iii) mezclar las porciones. De esta manera se asegura que todos los representantes de la biblioteca estén presentes en igual proporción en la forma de “una bolilla-un péptido”, puesto que cada bolilla de resina tendrá una única entidad peptídica. Para identificar las bolillas que tienen afinidad por la proteína de interés, y por lo tanto la unen, se lleva a cabo un *screening* en fase sólida utilizando anticuerpos anti proteína de interés conjugados con enzimas que produzcan reacciones de color o compuestos fluorescentes, o directamente se marca la proteína de interés. Las bolillas que adquieren color o fluorescencia en el *screening* contienen los péptidos que van a ser luego reconocidos por secuenciación y serán unidos a un soporte para conformar la matriz de afinidad necesaria para la purificación de las inmunoglobulinas a partir del extracto acuoso de la yema de huevo.