

PROPUESTA DE ASESORAMIENTO Y CONSULTORÍA PARA EL DESARROLLO E INNOVACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS INMUNOTERAPÉUTICOS DEL INPB

El asesoramiento y consultoría tiene por finalidad la revisión y mejoramiento de los procesos actuales de producción de medicamentos inmunoterapéuticos, proponiendo protocolos y supervisando su ejecución, así como también proponer nuevas técnicas que permitan aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de los productos finales. Además, se asesorará durante el desarrollo e innovación de estrategias alternativas de producción de inmunoterapéuticos basados en anticuerpos obtenidos a partir de huevos de gallinas hiperinmunizadas.

MEJORA DEL PROCESO ACTUAL DE PURIFICACIÓN Y MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS A PARTIR DE PLASMA DE CABALLOS HIPERINMUNIZADOS

En este ítem se pretende optimizar la técnica actual de digestión pepsínica y precipitación con sulfato de amonio, que es laboriosa y de bajo rendimiento. Dicha técnica, autorizada por la ANMAT, deberá ser utilizada hasta que pueda ser reemplazada por una opción superadora autorizada por la ANMAT. En una etapa posterior se ensayarán y optimizarán metodologías alternativas basadas en el empleo de ácido caprílico como agente precipitante selectivo, que posee reconocidas ventajas.

Objetivo

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, se propone optimizar la metodología de digestión con pepsina y precipitación con sulfato de amonio 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.

Hipótesis de trabajo

El camino seguido como primer paso por muchos de los procesos reportados en la literatura (Morais y col., 2014) para la obtención de fragmentos (Fab')₂ es la digestión del plasma equino hiperinmune con pepsina y su posterior precipitación con sulfato de amonio. Sin embargo, el análisis de los mismos revela significativas diferencias en las condiciones utilizadas: dilución del plasma, pH, temperatura, tiempo de incubación y concentración de pepsina o relación pepsina:proteína.

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. Otros fabricantes utilizan otras condiciones en procesos no optimizados. Todo esto redundaría en un menor rendimiento de fragmentos (Fab')₂, por lo que lo indicado es la aplicación de un esquema de diseño factorial para la optimización de cada etapa del proceso. Este tipo de diseño permite el estudio del efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable, con un mínimo de experimentos (Box y col., 2005)

En experimentos previos, se estudió el efecto de distintas variables (temperatura, tiempo de incubación, relación enzima:sustrato, fuerza iónica, etc.) sobre la etapa de digestión pepsínica del plasma bivalente anti-Bothrops para obtener los fragmentos F(ab')₂, obteniéndose resultados preliminares que serán confirmados en esta nueva consultoría, donde además el estudio se extenderá a otros antivenenos (crotálico, araña, escorpión).

Los estudios preliminares de optimización del procesamiento de plasma bivalente anti-Bothrops han permitido concluir que:

- Alterando las variables actualmente empleadas en el paso de digestión es posible asegurar mínimos contenidos de inmunoglobulina sin digerir en el digesto, con menores contenidos de agregados.
- Alterando las variables actualmente empleadas en el paso siguiente (termo-coagulación y *salting out*) es posible incrementar tanto los rendimientos como la calidad del producto.

En la presente propuesta se podrán confirmar estos resultados y extenderlos al resto de los antivenenos elaborados en el INPB Malbrán, inclusive a la purificación de anticuerpos anti-SARS-COVID2 generados por hiperinmunización de caballos tanto con virus atenuado como con proteínas del virus generadas por tecnología recombinante.

PROCESO INNOVATIVO PARA EL PROCESAMIENTO DE PLASMA DE CABALLOS HIPERINMUNIZADOS PARA LA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIVENENO POR PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO CAPRÍLICO

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. reportaron la aplicación de ese método a la producción de sueros antiveneno a partir de plasma equino hiperinmune. Dicho método permite –en un solo paso- obtener una preparación muy enriquecida en inmunoglobulinas con alto rendimiento y buena capacidad neutralizante del veneno. Las variables del proceso de precipitación optimizadas por esos autores fueron la concentración de ácido caprílico, el pH, y el tiempo e intensidad de la agitación. Como conclusión, su proceso optimizado requiere 5 % de ácido caprílico, pH 5,8 y agitación violenta.

En un trabajo anterior aplicamos el diseño factorial para optimizar estas variables (Nudel y col., 2012). Se evaluó la velocidad de filtración, el contenido de albúmina y

proteínas totales, la turbidez y los agregados de proteínas, y por inclusión de la temperatura entre los parámetros a optimizar se logró una mejora sensible en la velocidad de filtración y en la albúmina remanente en el sobrenadante con respecto al método de Rojas y col., que es el habitualmente utilizado en los laboratorios que preparan sueros antiveneno con IgG entera por precipitación de plasma equino con ácido caprílico.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en todos los experimentos, las mejores condiciones para la precipitación con ácido caprílico de plasma equino hiperinmune para la producción de sueros antiveneno son las siguientes:

- Concentración de ácido caprílico = 3 %
- pH del plasma = 5,3
- Temperatura = 40° C

En estas condiciones, se obtiene un sobrenadante totalmente enriquecido en inmunoglobulinas, que muchos laboratorios lo usan, luego de concentrarlo por ultrafiltración, directamente como producto final (suero antiponzoñoso).

Si el producto final requerido no es la inmunoglobulina entera sino su fragmento $F(ab')_2$, es necesario un clivaje enzimático, que normalmente se realiza por incubación con pepsina.

Al igual que para la digestión pepsínica del plasma hiperinmune, para la digestión de la inmunoglobulina purificada es necesario un estudio por diseño factorial para encontrar las mejores condiciones de clivaje, tarea que se llevará a cabo en esta propuesta. En este caso las condiciones de clivaje van a ser distintas que las usadas para la digestión del plasma entero, y se prevé un mayor rendimiento y mejor calidad del fragmento $F(ab')_2$ producido.

ESCALADO A NIVEL PILOTO DE LOS PROCESOS OPTIMIZADOS

Se escalarán a nivel piloto (5-10 litros de plasma) todos los procesos optimizados, teniendo en cuenta todas mis recomendaciones para esta tarea, previendo que el aumento de escala redundará en un mayor rendimiento de producto final.

SUEROS HETERÓLOGOS PARA TRATAR ENVENENAMIENTOS E INTOXICACIONES BASADOS EN LA TECNOLOGÍA IGY (ANTICUERPOS DE YEMA DE HUEVO).

En el año 2014 al Consorcio Asociativo Público-Público (CAPP) conformado por la ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) les fue adjudicado un instrumento de financiamiento de código Producción Pública de Medicamentos N°03 (PPM N°03), a través del Fondo de Innovación Tecnológica Sectorial de Salud (FITS-S) 2013 del Fondo Argentino Sectorial (FONARSEC). El mismo contemplaba un período inicial de tres años para su desarrollo (2014-2017). Luego de este período y tras sendas evaluaciones negativas de los informes de avance presentados, se decide reemplazar a la Dirección Técnica del Proyecto, a cargo de la Lic. Maria Luisa Brero y la Mag. Patricia Geoghean como Subdirectora Técnica, por los Dres. J. Christian

Dokmetjian y Osvaldo Cascone como Director y Subdirector Técnico del Proyecto en cuestión, respectivamente. En paralelo, se solicita (y se otorga) una prórroga del período de ejecución del proyecto, entendiendo la relevancia de las actividades propuestas y las potencialidades de los desarrollos alcanzados. Lamentablemente, las actividades planteadas para el cierre del proyecto, a ejecutarse en el primer semestre de 2020, debieron ser pospuestas al segundo semestre, presentándose una nueva solicitud de prórroga.

Objetivo

El objetivo general de este proyecto es la investigación, el desarrollo y la producción en escala piloto de antisueros basados en anticuerpos IgY de yema de huevo para ser usados en caso de mordeduras y picaduras de animales ponzoñosos en el ámbito de la salud pública nacional y regional como sustituto y/o complemento de los actuales antivenenos heterólogos producidos en equinos.

Los objetivos específicos comprenden los siguientes ítems: a) Hiperinmunización de gallinas ponedoras con venenos de animales ponzoñosos, b) Purificación de anticuerpos IgY a partir de las yemas de los huevos de las gallinas hiperinmunizadas, c) Realización de pruebas de potencia e inocuidad in vitro e in vivo de los antisueros producidos, d) Formulación y generación de lotes piloto y estudio de su estabilidad.

Las ventajas de la producción de sueros heterólogos como terapéuticos utilizando la tecnología IgY con respecto a la producción tradicional a partir de equinos hiperinmunizados, tanto en relación con los costos productivos como con la posibilidad de control del estado sanitario de los animales. En el presente período de trabajo, segundo de semestre de 2020, los objetivos específicos son los enunciados en los incisos c) y d) del párrafo anterior.

Hipótesis de trabajo

En el período anterior del Proyecto se han obtenido los parámetros de escalado necesarios para la generación de un lote piloto, se han redactado protocolos de Técnicas Analíticas y Protocolos Operativos Estandarizados y ha tenido lugar una capacitación del personal del INPB planificada. Además, se ha comenzado a trabajar en una formulación alternativa de antivenenos de la cual se esperan no solo ventajas en cuanto a su estabilidad térmica sino además un mayor volumen de distribución luego de su administración respecto a la molécula de IgY entera.

Actividades

Se cuenta con un total de 150 huevos de gallinas hiperinmunizadas con veneno de *Bothrops alternatus*, conservados en refrigeración, listos para ser utilizados en la formulación de un lote piloto de antivenenos basados en la tecnología IgY. Para ello se emplearán los protocolos de producción desarrollados en el período previo del proyecto. Una vez formulado el mismo, se efectuarán los controles de calidad pertinente, tomando como referencia los controles habitualmente empleados por el INPB para sus antivenenos producidos a partir de plasma equino. Finalmente, se realizarán estudios de estabilidad acelerada sobre los mismos.

En paralelo, se continuarán las actividades de desarrollo de una formulación alternativa de antivenenos basada en el fragmento Fab de la IgY de gallinas, buscando una caracterización exhaustiva tanto de sus propiedades fisicoquímicas como de sus actividades biológicas de neutralización de los efectos tóxicos de venenos Bothrópicos.

BIBLIOGRAFÍA

Box, G.E.P., Hunter, J.S., Hunter, W.G. (2005) *Statistics for experimenters: Design, Innovation and Discovery*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, U.S.A.

MacKinnley, M.M. and Parkinson, A. (1987) A Simple, Non-Chromatographic Procedure to Purify Immunoglobulins From Serum and Ascites Fluid. *J. Immunol. Methods*, 96, 271-278.

Morais, V., Berasain P., Massaldi, H. (2014) Immunoglobulin purification by caprylic acid. En: *Methods in Molecular Biology. Protein downstream processing: design, development and application of high and low-resolution methods*, vol 1129, chapter 13. Springer Science.

Nudel, B.C., Perdoménico, C., Iácono, R. and Cascone, O. (2012) Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon*, 59, 68-73.

Perosa, F., Carbone, R., Ferrone, S. and Dammacco, F. (1990) Purification of Human Immunoglobulins by Sequential Precipitation With Caprylic Acid and Ammonium Sulphate. *J. Immunol. Methods*, 128, 9-16.

Rojas, G., Jiménez, J.M., Gutiérrez, J.M. (1994) Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351-363.

Steinbuch, M. and Audran, R. (1969) The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 279-284.