



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE MORENO**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA

Código: PICYDT-CAyT-07-2022

“PRODUCCIÓN DE SUEROS HETERÓLOGOS HIPERINMUNES ANTI SARS-COV-2 Y ANTIRRÁBICO. OPTIMIZACION DE BIOPROCESOS”

Director: PEREZ, Oscar

Co Director: CASCONI, Osvaldo

Integrantes: MICUCCI, Matías; FINGERMAN, Matías; GONZALEZ
VIACABA, Belén.

Año: 2024



Informe Final de Proyectos de Investigación Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

Tipo de proyecto y año de convocatoria:	PICYDT UNM VII 2021
Nombre completo del proyecto:	Producción de sueros heterólogos hiperinmunes anti SARS-CoV-2 y antirrábico. Optimización de bioprocesos
Director/a:	Lic. Oscar Pérez
Lineamiento prioritario ¹	Investigación e Innovación en Biotecnología Bioprocesos y aplicaciones biotecnológicas
Fecha de inicio:	
Fecha de finalización:	
Unidad de localización:	Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología
Departamento/centro/Programa	Ninguno Programa para la Investigación e Innovación en Biotecnología
Resumen: <i>a(máx. 300 palabras)</i>	Desde hace más de un siglo la utilización de sueros heterólogos (equinos principal-mente) y homólogos (pacientes convalcientes) ha sido un método terapéutico efectivo contra mordeduras de animales venenosos, infecciones bacterianas (tétanos, difteria) y virales (coronavirus, rabia). En la actualidad se utiliza, principalmente, un método de purificación de anticuerpos a partir de plasma equino hiperinmune, para la producción de medicamentos con actividad antiviral a nivel industrial, obteniéndose preparaciones enriquecidas en moléculas F(ab) ² . Este fragmento de las inmunoglobulinas tiene clivado el Fc, responsable de generar inmunogenicidad y efectos adversos en el huésped. Básicamente, el método consiste en un fraccionamiento de proteínas empleando sulfato de amonio o ácidos grasos de cadena corta. Para la obtención del fragmento F(ab) ² se realiza una digestión enzimática con pepsina, previa o posterior al fraccionamiento proteico. En esta metodología se observa una importante pérdida de capacidad neutralizante en comparación con la correspondiente al plasma de partida. En este proyecto se propone, en primera instancia, obtener dos lotes de plasmas hiperinmunes: uno antiSARS y otro antirrábico empleando, como inmunógenos, proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2 y virus rábico inactivado, concentrado y purificado. Luego, los objetivos se enfocan en optimizar los procesos para la conservación de masa proteica y actividad neutralizante, luego de la precipitación proteica, empleando una combinación de técnicas cromatográficas y de ultrafiltración tangencial.

¹ Según Resolución CS 326/17 Líneas de investigación científica y desarrollo tecnológico prioritarias 2016-21/6 Res. R 449/18 Lineamientos estratégicos generales de Investigación y transferencia 2019/21 del CEDET

	De esta forma, este proyecto apunta a desarrollar dos medicamentos antivirales, cuyos ingredientes farmacéuticos activos (IFA) sean fragmentos de inmunoglobulinas específicas con un alto perfil de seguridad (mínima carga de pirógenos) y con elevado título seroneutralizante, medido en cultivo celular para el suero antiSARS y en modelo murino para el correspondiente antirrábico.
Palabras claves:	Rabia – COVID – Medicamentos inmunoterapéuticos – Optimización de bioprocesos

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²

1. Introducción y objetivos (mínimo 1 página- máximo 2 páginas)

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).

- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

Este proyecto no está enfocado en el desarrollo tecnológico de un inmunobiológico novedoso, pero tiene como objetivos generar innovaciones y mejoras sobre los procesos de producción tradicionales ingredientes farmacéuticos activos (IFA) de medicamentos inmunoterapéuticos policlonales heterólogos producidos en una de las instituciones públicas productoras de biológicos más importantes de nuestro país. Se emplearán dos productos en desarrollo, uno denominado suero antirrábico y otro anti-SARS-CoV-2 como modelos, por su relevancia al momento de inicio del proyecto, los cuales han sido desarrollados en base a la plataforma tradicional de producción de antivenenos del INPB. De esta manera, los desarrollo de bioprocesos sobre los que se ha trabajado en este proyecto podrán ser aplicados en forma directa para el resto de los medicamentos relacionados producidos por el INPB.

² Se solicita brindar información detallada en los campos que componen esta Parte I, ya que será publicada en el Repositorio online de la UNM. Esto permitirá difundir de manera amplia la investigación, sus resultados y visibilizar la labor de los miembros del equipo de investigación.

Para el tratamiento antirrábico actualmente se emplea gammaglobulina antirrábica humana, definida como una solución concentrada y purificada de anticuerpos preparada a partir de hemoderivados de individuos sanos inmunizados contra la rabia. Es un biológico de producción limitada y alto costo, de origen importado. Se administra simultáneamente con la primera dosis de vacuna (día “cero”). Si no hubiese podido aplicarse en ese momento, no debe administrarse después del séptimo día de la primera dosis de vacuna para no interferir en la respuesta inmunológica que ésta debe inducir. En caso de que corresponda administrarla, debe efectuarse lo antes posible y nunca después del séptimo día de iniciada la vacunación. La inmunoglobulina debe infiltrarse dentro y alrededor de la herida (20UI/Kg de Inmunoglobulina derivada humana).

Este biológico es distribuido por el Ministerio de Salud de la Nación (MSAL), y su administración depende del animal agresor, de la región geográfica y de la persona afectada, siendo indicada de acuerdo con 4 categorías establecidas por el MSAL. La situación sanitaria global, puesta de manifiesto durante la pandemia, muestra un contexto de vulnerabilidad en lo que respecta a la atención de varias patologías, dentro de las cuales se encuentra la rabia. Existen problemas en la producción y distribución de vacunas y gammaglobulina. También, al ser homóloga la gammaglobulina que existe en el mercado, la producción y, por ende, provisión del mismo es acotada y dirigida hacia países donde la rabia es endémica.

Otra premisa a considerarse es que la respuesta inmune humoral depende de muchos factores y varía de paciente a paciente. La producción de este tipo de biológico está supeditada a la oferta de donantes, es decir, de individuos sanos vacunados, que de por sí es acotada. A esta limitación se suma que existe la potencial exclusión de muestras en función de los criterios que se utilizan en la actualidad para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades. Atendiendo a esta emergencia, desde el año 2021, el INPB-ANLIS intenta reactivar la producción de suero antirrábico heterólogo, y así de esta forma sustentar medidas de intervención adoptadas por el MSAL. En los ensayos de hiperinmunización equina se utilizará virus rábico inactivado cuyos protocolos de producción fueron generados a lo largo del proyecto PICyDT 2017 “Desarrollo de técnicas de downstream para la obtención a escala de vectores virales recombinantes” y en el PI2018 “Desarrollo de un método downstream de concentración y purificación antigénica por ultracentrifugación aplicado a vacunas antirrábicas de segunda y tercera generación”.

Por otra parte, el INPB-ANLIS se encuentra desarrollando un medicamento para el tratamiento de casos agudos graves por COVID 19, a partir de plasmas de equinos hiperinmunes. El inmunógeno utilizado para su elaboración fue el dominio de unión al receptor celular (RBD) de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2. Este polipéptido fue obtenido mediante técnicas de ADN recombinante expresándose en células HEK y

luego purificado. El plan de inmunización y la purificación posterior del plasma equino fueron realizados según protocolos de rutina usados en el INPB para la obtención de sueros antiofídicos y antiarácnicos. Este antiviral está en la etapa final de un ensayo clínico.

Como se comentó inicialmente, para este caso al igual que para el resto de los medicamentos producidos por esta tecnología por el INPB mediante el presente proyecto se trabajó en el desarrollo de mejoras para alcanzar una mayor productividad en el proceso y una mejora en la calidad de los productos.

Hipótesis: Es posible realizar innovaciones y mejoras sobre el proceso de producción de medicamentos inmunoterapéuticos policlonales heterólogos actualmente empleado en el mayor productor público nacional de estos productos, tales que permitan subir la productividad y obtener productos finales con mejores perfiles de calidad y seguridad.

Objetivo general: Desarrollar mejoras sobre el proceso productivo tradicional de este tipo de medicamentos tomando como ejemplo dos medicamentos en desarrollo, un antiviral contra SARS-CoV-2 y uno contra el virus rábico, esperando alcanzar productos de mejor calidad que los que pueden producirse con la tecnología actual.

Objetivos específicos:

1. Producir lotes de plasma equino hiperinmune aptos para la producción de un IFA antirrábica.
2. Estudiar innovaciones y mejoras aplicables a la producción de IFA antirrábica y anti-SARS-CoV-2, basadas en la introducción de modificaciones sencillas y de bajo costo (ensayo de polioles protectores

contra los efectos negativos de la acidez, agentes delipidantes, medios cromatográficos para la remoción de agregados proteicos) sobre etapas iniciales y avanzadas del proceso actualmente utilizada por el instituto productor.

2. Marco de referencia (min. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.
- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

El animal de elección para la producción de antivenenos (ofídicos y aracnídicos) es el caballo, dada su elevada volemia, buena respuesta a antígenos, larga vida productiva y amplia experiencia en su uso para la producción de este tipo de productos. Si bien inicialmente el tratamiento de humanos se basaba en el uso de suero completo proveniente de equinos hiperinmunes, la alta tasa de efectos adversos tales como reacciones de hipersensibilidad inmediata (anafilaxia) en individuos alérgicos e hipersensibilidad tardía (enfermedad del suero) así como reacciones anafilactoideas llevó años más tarde al desarrollo de protocolos productivos en los cuales se lograba eliminar la mayor parte de los componentes responsables de estos efectos, pero manteniendo los efectos biológicos deseados [1]. El proceso desarrollado por Pope y trasladado a escala industrial por Harms a mediados del siglo pasado, basado en el tratamiento del plasma equino hiperinmune con pepsina y eliminación de los subproductos no deseados por medio de tratamiento térmico combinado a la precipitación diferencial con sulfato de amonio continúa siendo a la fecha el más ampliamente utilizado a escala global [2,3]. El ingrediente farmacéutico activo (IFA) generado mediante este proceso son los fragmentos F(ab)² de las IgG equinas.

La rabia es una enfermedad viral zoonótica, que produce una encefalitis aguda casi siempre mortal una vez que han aparecido los síntomas clínicos. En hasta el 99% de los casos humanos, el virus de la rabia es transmitido por perros domésticos. La rabia afecta a animales domésticos y salvajes de sangre caliente y habitualmente se propaga a las personas por inoculación de saliva a través de mordeduras. Se estima un número de 59000 muertes anuales en todo el mundo [4]. La rabia ocurre en dos formas epidemiológicamente diferentes: rabia urbana, con el perro como reservorio y transmisor; y la rabia silvestre, con diferentes especies de vida silvestre actuando como reservorios o transmisores. El agente causal de la enfermedad de la rabia es el virus rábico (RABV), miembro del género *Lyssavirus* perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*. Su genoma está constituido por una molécula de ARN de cadena simple, no segmentada, de polaridad negativa, de aproximadamente 12 Kb. El genoma viral codifica para 5 proteínas estructurales. La proteína G es la única glicosilada. Produce las proyecciones triméricas tipo espigas en la superficie de la envoltura viral. Está glicosilada y es responsable de la adsorción del virus a su receptor específico presente en la superficie de las células blanco. Es el principal antígeno viral contra el que están dirigidos los anticuerpos neutralizantes producidos por la respuesta inmune del huésped [5]. La vacunación es la herramienta principal para la prevención y control de la enfermedad. Sin embargo, en accidentes de mordedura graves, potencialmente rábicos, se aplica localmente inmunoglobulinas monoclonales o sueros heterólogos, en ambos casos, específicos contra el VR, en paralelo con un esquema de vacunación multidosis post-exposición. Sin la administración de vacuna, y gammaglobulina (en accidentes graves), la progresión de la infección por RABV lleva a la muerte del individuo [6]. El tratamiento de los casos de accidentes graves con productos derivados de sueros heterólogos se ha realizado desde fines del siglo XIX [7]. Su empleo estaba fundamentado en lograr una rápida neutralización de la replicación viral en los lugares anatómicos injuriados por la mordedura vía la instilación de suero localmente. En la década del 60 en EE.UU. se comenzó a emplear gammaglobulina antirrábica obtenida a partir de sangre de individuos vacunados ya sea por accidentes rábicos o voluntarios de fuerzas armadas y personal de laboratorio sometidos a tratamiento preexposición. Hasta fines de la década del 90, el INPB-ANLIS produjo suero antirrábico heterólogo para provisión al MSAL. El producto fue discontinuado por decisión política en pos de la importación de suero homólogo. Lamentablemente, desde hace algunos años la producción de este producto es escasa en comparación con su demanda. En este contexto y ante la escasez de medicamentos inmunoterapéuticos homólogos para el tratamiento, la recuperación de las capacidades productivas de su equivalente producido a partir de caballos hiperinmunizados resulta clave para poder enfrentar esta situación adversa a nivel sanitario.

El brote de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causado por el virus del síndrome respiratorio agudo severo tipo-2 (SARS-CoV-2), fue declarado como una pandemia en marzo de 2020. Las tasas de letalidad se estiman entre 1% y 3%, afectando principalmente a los adultos mayores y a aquellos con comorbilidades, como hipertensión, diabetes, enfermedad cardiovascular y cáncer. Los coronavirus tienen una envoltura lipídica con tres proteínas ancladas en ella, denominadas E (envoltura), M (membrana) y S (del inglés, spike, o espícula), la cual le da al virión la apariencia de una corona, y es la proteína que media la unión al receptor ACE2. Éste se encuentra presente en mayores cantidades en el riñón, los pulmones y el corazón [8]. El empleo de un medicamento antiviral equivalente al mencionado producto antirrábico en desarrollo representa una alternativa con elevado potencial de efectividad para el tratamiento agudo de casos graves de COVID 19.

El INPB-ANLIS tiene dentro de su portafolio de productos suministrados al MSAL para su distribución federal, los antivenenos utilizados en el país para tratamientos de mordeduras o picaduras provocadas por animales ponzoñosos. La plataforma productiva de los mismos será la base sobre los que se sustenta este proyecto y que, de lograr los objetivos propuestos, podrá ser optimizada en función de los desarrollos tecnológicos alcanzados. El NPB-ANLIS está habilitado por la autoridad regulatoria nacional (ANMAT) como establecimiento elaborador / importador-exportador de medicamentos de origen biológico según Disposición ANMAT N°10206/17. En 2019, se amplió el alcance de la habilitación como elaborador de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) de origen biológico para la producción de antivenenos y antitoxinas - Productor de suero hiperinmune como material de partida utilizado para la producción de IFA de los antivenenos ofídicos y aracnídeos. (DI-2019-705-APN-ANMAT#MSYDS).

Como ha sido mencionado, hasta la década del '90 del siglo pasado el INPB producía también un medicamento antirrábico heterólogo producido bajo la misma plataforma productiva que sus antivenenos. Este proyecto se enmarca en un esfuerzo institucional de recuperar las capacidades productivas perdidas. El INPB se encuentra además desarrollando un medicamento anti SARS-CoV- 2 , también basado en la misma plataforma, que se encuentra cursando la Fase 2/3 de ensayo clínico. Los integrantes de este proyecto han participado en el desarrollo de este producto [9], teniendo a disposición el plasma de equinos hiperinmunes necesario para las propuestas de desarrollo e innovación vinculadas con este proyecto.

Respecto a los desarrollos de bioprocesos, el tratamiento con pepsina ha mostrado no solamente degradar la región Fc de los anticuerpos sino además el resto de las proteínas acompañantes, pero en paralelo produce una fuerte inducción de la agregación de $F(ab')_2$ como consecuencia de la elevada acidez requerida para la actividad enzimática (pH 3.20) [10]. La mayor parte de los agregados son eliminados en un paso que combina la acción del sulfato de amonio y del calor en promover las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de elevado tamaño molecular induciendo su separación como sólidos (mediante filtración en lecho profundo y/o centrifugación). Sin embargo, la remoción de agregados no es total, con lo cual una parte de estos se mantiene en solución, existiendo diferencias en el contenido en estos en los productos finales no solo entre los diferentes productores sino además entre lote y lote de un mismo productor [11]. Los agregados son, como se explica en otras secciones, el principal responsable de efectos adversos tempranos luego de la administración de este tipo de productos, siendo su determinación recomendada en documentos de referencia internacionales a nivel productivo [12]. Lamentablemente, la reducción de los niveles de agregados con el objeto de asegurar antivenenos de mejor calidad ha sido objeto de escaso interés en la literatura. Esto contrasta marcadamente con la situación de otros productos relacionados, como los anticuerpos monoclonales.

Como ha sido mencionado, el punto crítico en la formación de agregados macromoleculares es el paso de digestión con pepsina y su causa es la acidez requerida para un tratamiento enzimático eficiente. Los polioles, como el sorbitol, han sido utilizados para la protección de las características conformacionales nativas de macromoléculas en entornos de alta acidez, incluidas las inmunoglobulinas [13,14]. En este proyecto hemos evaluado el posible efecto protector del sorbitol de la estructura de las macromoléculas en las condiciones de acidez necesarias para el paso de tratamiento con pepsina del plasma equino hiperinmune, esperando prevenir o minimizar la formación de agregados.

Por otra parte, las diferencias más relevantes a nivel fisicoquímico entre monómeros, dímeros y estructuras de mayor orden de las macromoléculas son su tamaño, hidrofobicidad y carga neta. La cromatografía de exclusión molecular permite la resolución de monómeros de estructuras de mayor orden pero, en la práctica su uso está generalmente restringido a escala de laboratorio o analítico [15]. La cromatografía de interacción hidrofóbica, por su parte, ha sido utilizada para la purificación y pulido de

anticuerpos monoclonales [16–18]. Sin embargo, la mayor parte de las fases estacionarias de este tipo poseen bajas capacidades de unión, con lo cual su uso ha recibido escaso interés productivo. Un aspecto relevante adicional es que todas estas, con una única excepción [17], requieren el uso de agentes cosmotrópicos, lo cual obliga a introducir pasos posteriores de cambio de medio [15]. La modalidad de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) ha sido también utilizada para la remoción de agregados en formulaciones de anticuerpos monoclonales. En ésta se hace uso de las diferencias en las cargas netas superficiales entre los distintos conformeros, utilizando estrategias de unión-elución, es decir, en la primer etapa se busca la unión de tanto los monómeros como las especies de mayor orden en condiciones de baja conductividad y luego se produce una elución diferencial de estas especies mediante la aplicación de un gradiente de conductividad, manteniendo el pH de la columna por debajo del pI de las proteínas [16,19,20]. La hidroxiapatita es otra fase estacionaria también utilizada con estos fines [21]. El mecanismo en el cual se basa su acción resulta de la combinación de interacciones electrostáticas con grupos fosfatos de la fase estacionaria y con iones Ca^{+2} unidos por fuerzas de quelación a la fase. Recientemente, se ha introducido también el uso de resinas mixtas, las cuales combinan las propiedades de las HIC y CEX tradicionales, para el pulido de formulaciones de anticuerpos monoclonales [22,23]. Las columnas monolíticas representan una alternativa a los sistemas cromatográficos tradicionales, basados en el empleo de resinas y materiales particulados [24]. En este medio la fase móvil fluye a través de los canales abiertos de un monolito simple, interaccionando con la fase estacionaria en las paredes de los canales. En contraposición con las fases estacionarias tradicionales, los fenómenos de transporte y la separación se encuentran gobernados por fuerzas convectivas en lugar de difusivas, de esta manera permitiendo condiciones de operación más rápidas así como un comportamiento constante en un amplio rango de flujos volumétricos de trabajo. Este tipo de medios ha mostrado ser particularmente eficiente para la resolución y unión de moléculas de muy alto tamaño molecular tales como proteínas multiméricas partículas similar a virus y virus [25]. En el presente proyecto hemos evaluado un paso de CEX basado en el uso de una fase estacionaria monolítica para el pulido final de IFA de medicamentos terapéuticos policlonales heterólogos orientado a la remoción de agregados de F(ab')_2 en estos y con ello buscando mejorar la calidad de los productos finales del proceso.

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicitar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

Preparación de muestras enriquecidas en multímeros de F(ab')_2 : Los plasmas de equinos hiperinunminizados (HEP), provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB, Buenos Aires, Argentina) fueron procesados esencialmente según un proceso optimizado previamente por el grupo de trabajo [10]. Brevemente, se produjeron inicialmente muestras enriquecidas en especies monoméricas de F(ab')_2 diluyendo el HEP al tercio en una solución 0,15 M de NaCl bajo agitación suave, la temperatura de la mezcla se llevó a 37°C y luego el pH se ajustó a 3,20 con HCl al 10 % p/v HCl. A continuación, se realizó un tratamiento con pepsina adicionando enzima a una proporción a 1:15 partes del contenido de proteína de la mezcla (Pepsina 1:10.000, Anedra, Buenos Aires, Argentina). Se dejó actuar durante una hora con agitación suave y posteriormente la reacción se frenó irreversiblemente mediante la adición de 10% p/v de NaOH hasta elevar el pH de la mezcla a 6,2 y bajando la temperatura de la solución a 30°C. En este punto, las especies de mayor peso molecular (dentro de las cuales se encuentran las formas multiméricas de F(ab')_2) se separaron de la solución mediante una precipitación inducida por el agregado de sulfato de amonio (Anedra, Buenos Aires, Argentina) hasta alcanzar una concentración final de 16% p/v, manteniendo una agitación moderada durante una hora. El precipitado fue separado mediante centrifugación durante 15 minutos a 10 kG y resuspendido en una solución 0.15 M de NaCl, diafiltrado en con 10 diavolumenes de la misma solución, empleando una membrana de ultrafiltración de celulosa regenerada de 30 kDa de corte de peso molecular (Ultracel® YM, MilliporeMerck, Darmstadt, Germany) en un dispositivo de celda agitada (Amicon®, Millipore-Merck, Darmstadt, Germany). Finalmente se realizó una concentración del material mediante el mismo dispositivo hasta alcanzar una concentración final de proteínas de 2.5 % p/v. La distribución macromoléculas de distintos tamaños moleculares en los purificados monoméricos de F(ab')_2 y en la resuspensión del precipitado fueron estimadas mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). A

partir de estos valores se generó una mezcla entre ambas fracciones de forma tal de alcanzar un contenido en especies multiméricas del orden del 10% de las especies totales en la mezcla final.

Análisis de la distribución de tamaños macromoleculares mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC): La distribución de tamaños moleculares de las macromoléculas que componen las diferentes muestras fue estimada mediante cromatografía líquida en modalidad SEC, empleando una columna de 7,8 milímetros de diámetro y 300 mm de largo, conteniendo como relleno partículas de sílice porosa de 5 μm de diámetro promedio de partícula y 290 Å de tamaño de poro (BioSep S-3000, Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) conectada a un FPLC ÅKTA Explorer100 (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) ó a un UHPLC Ultimate 300 (ThermoFischer Scientific, EEUU). Durante la equilibración de columna, inyección y elución de las muestras se trabajó en modo isocrático, empleando como solvente una solución 0.85 % p/v NaCl y 15 mM Fosfato de sodio, pH 6,50. El flujo de trabajo fue constante, de 0.75 ml/min, realizando el registro de absorción UV de 280 nm de longitud de onda a la salida de la columna. Los análisis de detección y cuantificación de los picos cromatográficos se realizaron empleando los software propietarios de ambos equipamientos, UNICORN 5.11 software (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) ó Chromeleon (ThermoFischer Scientific, EEUU), respectivamente, siguiendo las estrategias de integración valle a valle en todos los casos, en forma automática.

Remoción de agregados por cromatografía de intercambio catiónico (CEX): Se empleó un intercambiador catiónico fuerte basado en una fase estacionaria monolítica, la cual emplea un grupo sulfónico como ligando de intercambio (CIMmultus® SO₃, SartoriusBIA Separations, Ajdovscina, Slovenia). El volumen de columna (CV) fue de 1 ml y el diámetro de los canales de la fase estacionaria de 2 μm . Antes de cada experimento la columna fue equilibrada con 10 CV del mismo medio que se iba a usar para la carga en cada corrida. Durante los ensayos preliminares y de optimización se trabajó con una inyección de 2 CV de muestra, lavado con 10 CV de buffer de carga y luego una elución mediante un salto de conductividad empleando un buffer de elución de alta conductividad (solución 2,0 M de NaCl y 15 mM de Fosfato de Sodio el mismo pH que el buffer de carga). Al finalizar cada corrida se equilibró la columna con 10 CV del buffer de carga correspondiente. El flujo volumétrico de trabajo se mantuvo constante durante todas las corridas en 2 CV por minuto. Cada cinco corridas se adicionó un paso de limpieza con una solución 1 M en NaOH durante 10 CV y 2 M en NaCl por 5 CV y luego se equilibró por espacio de 15 CV con el buffer de carga deseado. La capacidad dinámica de union (DBC) fue definida como la cantidad total de agregados de F(ab')₂ que permaneció a unidos a la fase estacionaria cuando las corridas cromatográficas se realizaban bajo una serie de condiciones definidas antes que se verifique un quiebre significativo (10 %) en la unión de agregados F(ab')₂. La DBC se determina realizando una carga de la muestra y estimando la masa de agregados de F(ab')₂ en cada fracción de eluidos por SEC y expresando el valor por unidad de volumen de fase estacionaria (CE₁, CE₂, ..., CE_n). La unión a la columna (CB) se definió como la masa de agregados de F(ab')₂ que no eran eluidos y permanecían unidos a la fase estacionaria luego que cada fracción es eluida de la columna. Con el fin de calcular el CB, la masa de agregados de F(ab')₂ en la muestra original fue estimada, tomando en consideración además la dilución que tiene lugar en las primeras fracciones que atraviesan la columna. El contenido total proteico en estas fracciones se usó para normalizar el contenido de agregados de F(ab')₂ en las muestras originales (CF₁, CF₂, ..., CF_n) y luego el CB de cada fracción (CB_i) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: $CB_i = (CF_i - CE_i)$

Finalmente, la DBC se estimó como la masa acumulada de agregados de F(ab')₂ unidos a la columna para la fracción de eluatos a la cual el CB continuaba aún igual o por encima del 90% del valor máximo.

Evaluación de la capacidad protectora del sorbitol frente a la formación de agregados multiméricos durante el paso de digestión del HEP: El paso de digestión del HEP con pepsina se realizó en estos ensayos siguiendo el procedimiento descrito en secciones anteriores, pero adicionando cantidades diferentes de sorbitol y/o alternativamente bajo condiciones de pH diferentes, según se señala en la sección de resultados y discusión. El grado de digestión alcanzado bajo las diferentes condiciones de trabajo fue analizado sobre imágenes digitalizadas de electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida de muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción, teñidas acorde a la metodología de Azul de Coomassie coloidal, con la intervención de programas especializados (Image J).

Determinación de colesterol: Para la estimación del cambio en el contenido lipídico en las diferentes muestras se empleó un reactivo enzimático-colorimétrico comercial (Colestat, Laboratorios Wiener, Argentina).

Obtención de antígeno rábico: Se amplificó un lote de virus rábico Cepa CVS-Malbrán infectando un cultivo de células VERO sobre microcarriers Citodex-3 en botellones tipo spinner flask de 1 L. El crecimiento celular se realizó con medio MEM-D suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Argentina), y luego al momento de la infección la concentración del SFB descendió al 2 %. Los sobrenadantes individuales del cultivo infectado fueron cosechados, luego se juntaron todos estos en un único lote y este se inactivó químicamente mediante la adición de betapropiolactona e incubación 20 días a 37°C. Se realizaron los controles de calidad y esterilidad, los cuales fueron satisfactorios, registrándose un valor antigénico de 1,5 UI/ml. Se tomaron 150 ml del lote, se los clarificó por centrifugación 5 minutos a 5.000 G y luego sometidos a un proceso de ultracentrifugación por 3 h a 75.000 G y 5°C de temperatura. Se descartaron los sobrenadantes de cada tubo y los pellets conteniendo el antígeno viral fueron resuspendidos en 2 ml de PBS pH 7,4 y almacenado entre 2 y 8 °C hasta su uso. La concentración total de proteínas resultó 80 µg/ml, cuantificadas por método de Bradford. La calidad se analizó por medio de electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida, usando como criterio de calidad la presencia de una banda marcada de alrededor de 60 Kda (proteína G del virus rábico) y la ausencia de la banda correspondiente a la seroalbúmina bovina, contaminante principal del SFB:

Hiperinmunización equina con virus rábico: Dos caballos de raza mixta, talla mediana y 6 meses de edad fueron asignados al siguiente calendario de hiperinmunización con antígeno rábico.

Nro inmunización	Tiempo (días)	Adyuvante	Formulación x equino
1	0	Freund completo (AFC)	2,2 ml VRI + AFC 3,5 ml + PBS pH 7,4 csp 10 ml
2	15	Freund incompleto (FIA)	1,8 ml VRI + 3 ml FIA + PBS pH 7,4 csp 10 ml
3	21	Al(OH) ₃	1,8 ml VRI + Al(OH) ₃ 2 ml PBS pH 7,4 csp 10 ml
4	28	Al(OH) ₃	1,8 ml VRI + Al(OH) ₃ 2 ml PBS pH 7,4 csp 10 ml
5	35	Al(OH) ₃	1,8 ml VRI + Al(OH) ₃ 2 ml PBS pH 7,4 csp 10 ml
1ra reinmunización	84	Freund incompleto	1,5 ml VRI + 3 ml FIA + PBS pH 7,4 csp 10 ml
2da reinmunización	91	Al(OH) ₃	1,5 ml VRI + Al(OH) ₃ 2 ml PBS pH 7,4 csp 10 ml

Determinación de antigenicidad por ELISA indirecto: En cada pocillo de una placa de ELISA de 96 posiciones (Maxisorp® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) se depositaron 100 µl de una suspensión conteniendo 1 µg de antígeno en buffer carbonato de pH 9,6 e incubaron toda la noche a 4-8 °C. A continuación se retiró el líquido de los pocillos y se depositó sobre estos muestras de suero equino diluidas 1:4000 en buffer fosfato sódico (PBS) e incubaron por 60 min at 37 °C. Los pocillos fueron luego lavados 4 veces con 200 µl de PBS e incubados con una dilución 1:50,000 de un anticuerpo ovino anti-IgG de caballo conjugado a peroxidasa IgG (A6917, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante 60 min a 37°C. Se descartó luego el anticuerpo secundario y los pocillos se incubaron con 100 µl de TMB (3,30,5,50-tetrametilbenzidina), interrumpiendo el desarrollo de color mediante el agregado de 50 µl de ácido sulfúrico 2M a los 15 minutos. La intensidad de color desarrollada se cuantificó mediante la medición de la absorción de luz de 450 nm de longitud de onda en un lector de placas (Tecan GmbH, Grödig, Salzburg, Austria).

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el tema bajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).

- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

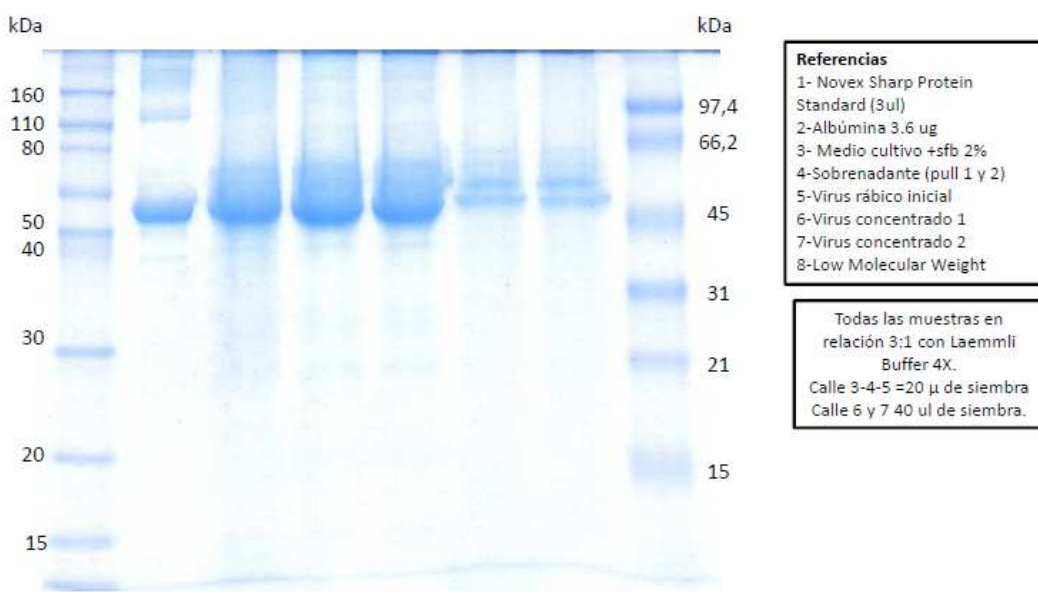
A lo largo del Proyecto se trabajó en el desarrollo de mejoras productivas sobre un proceso de producción de medicamentos terapéuticos utilizado desde hace varias décadas por el INPB de la ANLIS "Dr Carlos G Malbrán". Este proceso, históricamente utilizado para la producción de antivenenos, puede aplicarse (y lo ha sido a lo largo de la historia) a otros medicamentos dentro de los cuales se encuentran antivirales y antitoxinas. En el presente Proyecto, si bien orientado a la optimización de los proceso de producción de sueros heterólogos hiperinmunes anti SARS-CoV-2 y antirrábico, por las características intrínsecas del proceso abordado, las mejoras a desarrollar son extrapolables directamente a cualquier otro medicamento que emplee la misma plataforma productiva de fragmentos de anticuerpos policlonales heterólogos derivados del procesamiento de plasma de equinos.

A continuación se describen y discuten los resultados experimentales alcanzados a lo largo de este proyecto de optimización de bioprocesos:

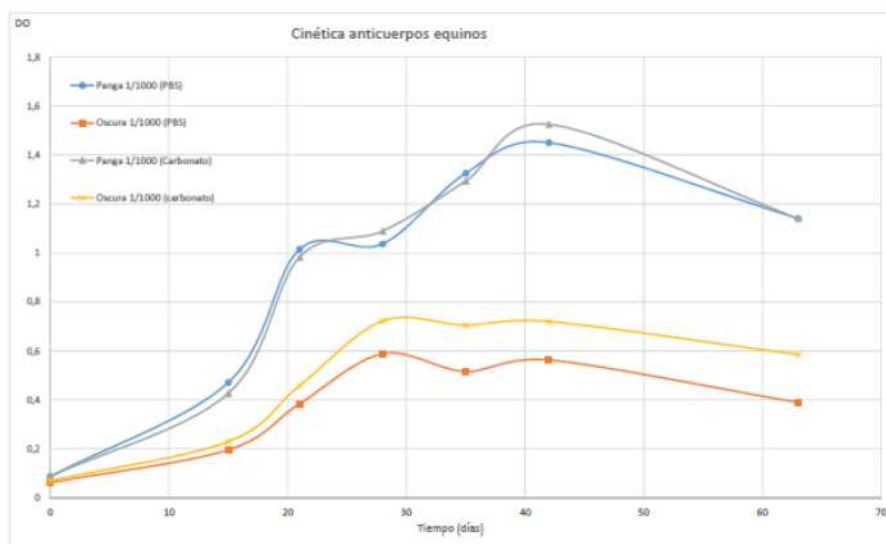
Desarrollo y optimización de un plan de hiperinmunización equina con virus rábico inactivado:

Con el fin de mejorar la productividad del proceso de obtención de plasma equino hiperinmune antirrábica, material de partida del proceso de producción de antiviral antirrábico, se abordó en una primera etapa el desarrollo de un plan de hiperinmunización equina con antígeno rábico producido según se describe en la sección correspondiente de materiales y métodos. El análisis de calidad del inmunógeno fue realizado por SDS-PAGE, observándose la siguiente imagen:

**SDS PAGE 12,5%
Sin Reducir**



Este antígeno rábico fue posteriormente utilizado para realizar un calendario de hiperinmunización sobre dos caballos del plantel productivo del INPB, con el final de generar lotes de plasma equino hiperinmune para el desarrollo de un ingrediente farmacéutico activo de un candidato de medicamento antirrábico de desarrollo. La cinética de respuesta humoral desarrollada en los caballos fue analizada mediante un ELISA indirecto, observándose los resultados que se señalan a continuación:

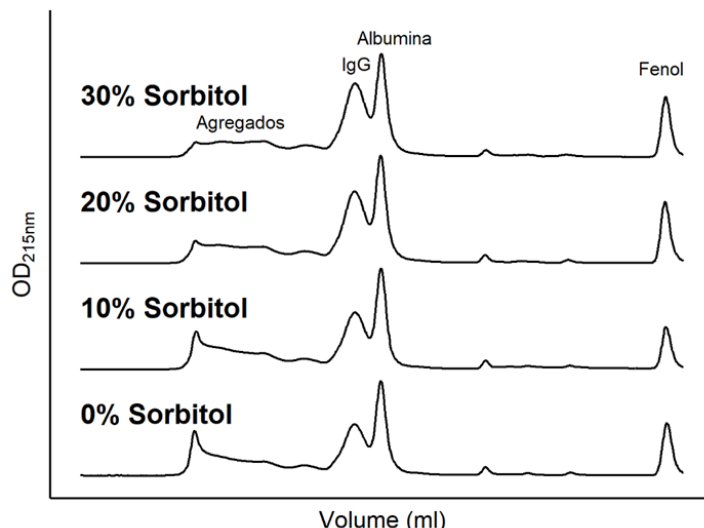


De acuerdo con lo observado en la anterior figura, se ha alcanzado un amesetamiento de la de respuesta humoral a partir de la quinta dosis, realizando luego una extracción productiva de sangre de los equinos siete días luego de la última dosis, con el fin de separar el plasma de estos equinos (6 litros por animal) para su posterior procesamiento en la plataforma de producción de antivenenos del INPB.

Evaluación del Sorbitol para el incremento en los rendimientos productivos del proceso de producción de Ingredientes Farmacéuticos Activos de medicamentos inmunoterapéuticos policlonales heterólogos:

En esta etapa del proyecto se buscó mejorar la productividad del proceso de producción de inmunoterapéuticos empleado en el INPB, focalizándose en un paso limitante del rendimiento: la digestión enzimática del plasma equino hiperinmune con pepsina para la generación de fragmentos Fab'2 de inmunoglobulinas.

Como ha sido descrito previamente por nuestro grupo de trabajo, las condiciones requeridas para realizar la digestión con pepsina del plasma hiperinmune poseen efectos deletéreos sobre el rendimiento del proceso a causa de la generación de agregados de inmunoglobulinas y sus moléculas derivadas [10]. De acuerdo con Lee y colaboradores el sorbitol actúa como estabilizante de inmunoglobulinas en condiciones de acidez extrema [13]. Por lo tanto, se decidió evaluar los posibles efectos estabilizantes del sorbitol durante el paso aludido y con ello, el potencial incremento en los rendimientos del paso asociados. Para ello, muestras de plasma equino hiperinmune fueron diluidas 1:3 con solución salina (NaCl 0.85% p/v), a la cuales se les adicionaron diferentes cantidades de sorbitol (0, 10, 20 y 30% p/v finales) y fueron luego expuestas durante 1 hora a las condiciones de pH y temperatura del paso de digestión con pepsina (pH 3.20, Temperatura 37°C), temperatura (pH al cual se efectúa el paso de digestión). Al final de este paso el pH de las muestras fue neutralizado mediante la adición de 1:10 de volumen de una solución de Tris 1M pH 8.0 y la distribución de macromoléculas de diferente tamaño molecular fue analizada mediante SEC. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

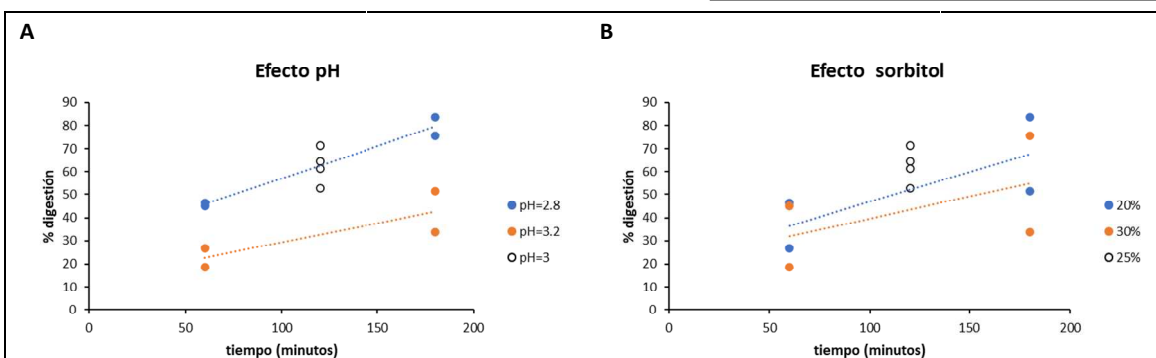


Como se observa en los cromatogramas de la figura anterior, el sorbitol muestra un efecto protector respecto a la generación de agregados, especialmente marcado en concentraciones iguales o superiores al 20%. Además, esta figura muestra lo antes señalado en relación a que los agregados se forman en gran parte por moléculas de inmunoglobulinas.

El sorbitol debe su efecto a la presencia de grupos funcionales alcohol asociados a cada uno de sus carbonos. Estos grupos funcionales interactúan tanto con las moléculas de agua del solvente, los aminoácidos de las proteínas y los protones libres, ejerciendo así los efectos estabilizantes observados sobre la conformación de las macromoléculas. Considerando que el mecanismo por el cual la pepsina ejerce su actividad enzimática depende no solo de su conformación sino además de la transferencia intermolecular de protones por medio de una catálisis ácida, el sorbitol pudiera afectar luego su actividad enzimática. Para estudiar este posible efecto, se realizó diseño experimental considerando 3 factores (concentración de sorbitol, pH y tiempo) y en dos niveles para cada uno de estos (Sorbitol 20% y 30%; pH: 2,8 y 3,2 y tiempo 60 min y 180 min). Con el fin que el ensayo permitiera identificar regiones de optimización posterior mediante la estimación de respuesta, se agregó un punto intermedio para el estudio de curvatura en la dependencia entre factores (Sorbitol 25%, pH 3,0 y tiempo 120 min). Los factores junto con sus codificaciones se detallan en la siguiente tabla:

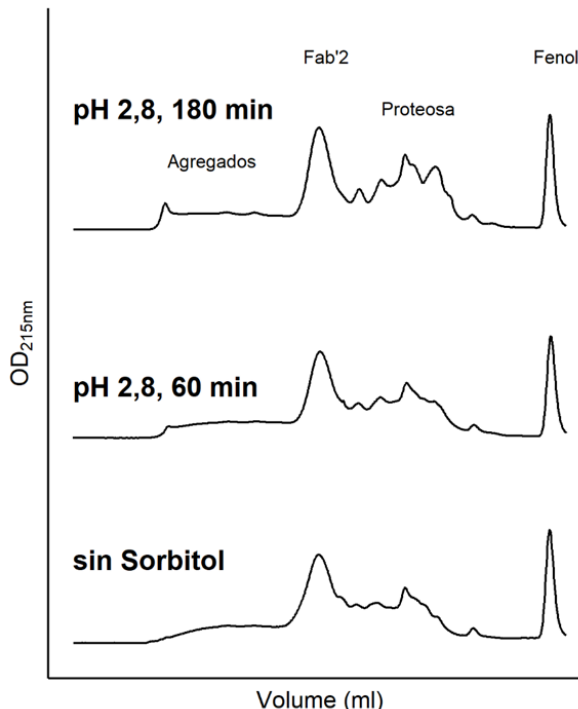
Factores	Niveles		
	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)
Sorbitol (%)	20	25	30
pH	2,8	3,0	3,2
Tiempo (minutos)	60	120	180

Por lo tanto, muestras de plasma hiperinmune fueron digeridas con pepsina siguiendo para el resto de las condiciones los niveles de los factores señalados en la tabla anterior. Al finalizar el tiempo establecido de reacción las muestras fueron neutralizadas mediante la adición de 1:10 de volumen de una solución de Tris 1 M pH 8,0 y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS PAGE). La intensidad de las bandas correspondientes a la molécula entera de IgG y los fragmentos Fab'2 fueron estimadas y se calculó a partir de estas el grado de digestión de las inmunoglobulinas alcanzado como la relación entre la intensidad de las bandas correspondientes a las IgG respecto a las Fab'2. Los resultados obtenidos se representan en la siguiente figura:



En los paneles A y B se muestran los % de digestión en función del tiempo de reacción tomando como efectos principales al pH (panel A) y al sorbitol (panel B). En primer lugar, considerando que en ninguna de las condiciones ensayadas se observó digestión completa, puede concluirse que el sorbitol impacta negativamente sobre la actividad enzimática de la pepsina. El análisis visual del panel A permite observar que el pH tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática, obteniéndose los mejores rendimientos a pH 2,8. El paralelismo de las estimaciones lineales (línea punteada) para las digestiones realizadas a pH 2,8 y pH 3,2 sugiere la ausencia de efectos interactivos entre el sorbitol y el pH dentro del rango de estudio. El paralelismo observado en el panel A a ambos pH es replicado en el panel B, reforzando la estimación de ausencia de efectos interactivos. El panel B muestra además que los cambios en la concentración de sorbitol dentro del rango ensayado no tienen efecto significativo sobre la actividad enzimática. Puede por lo tanto concluirse que los mayores grados de digestión observados resultaron de la combinación de pH 2,8 y tiempo 180 minutos.

En paralelo, se analizaron los efectos de la introducción de sorbitol sobre la composición en las especies de diferente tamaño molecular para las digestiones realizadas a pH 2,8 a los 60 y 180 minutos, en comparación con la digestión en condiciones tradicionales de reacción (1 hora a pH 3,2, en ausencia sin presencia de sorbitol):



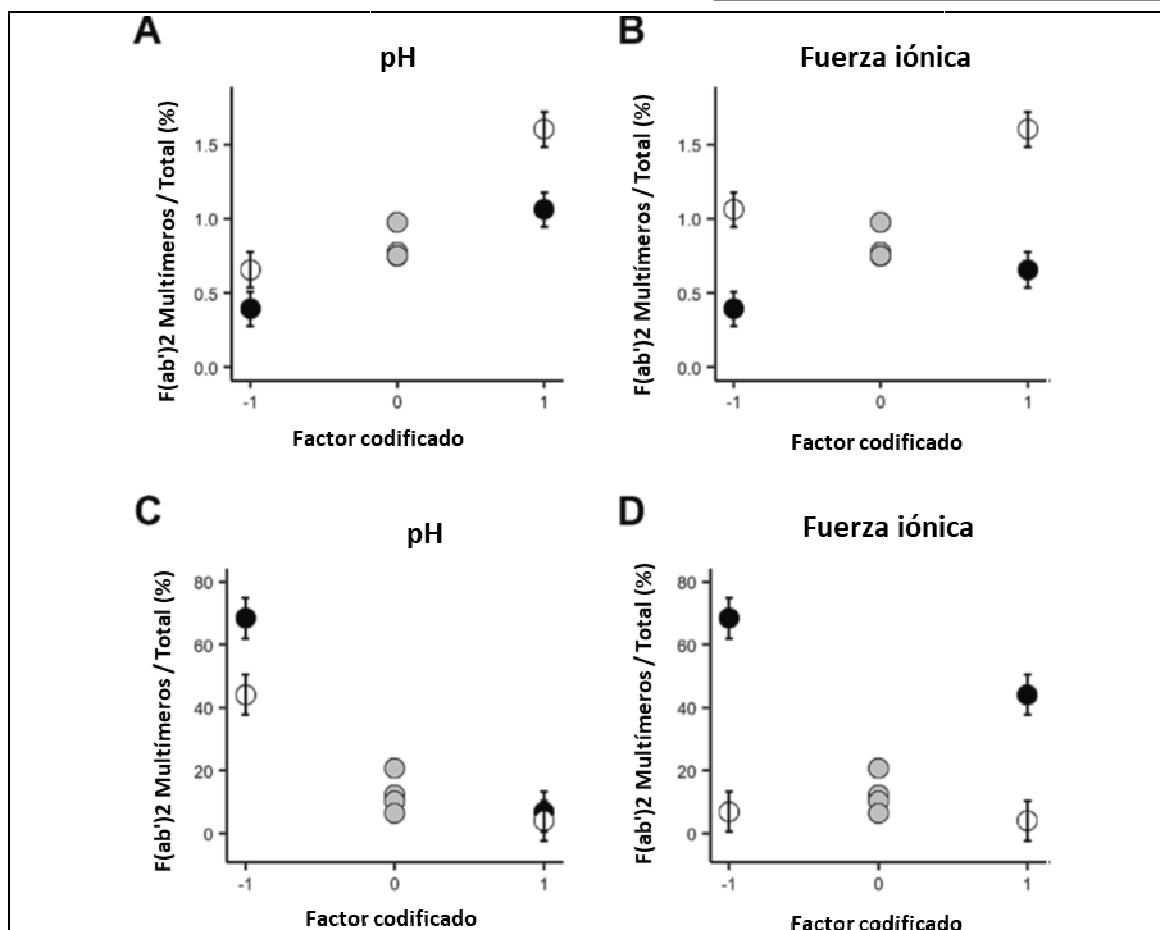
La Figura anterior muestra que, a pesar del demostrado efecto inhibitorio del sorbitol sobre la formación de agregados con el pH, su inhibición paralela de la actividad enzimática de la pepsina obliga a descender el pH a 2,8, por debajo de la condición tradicional de 3,2, lo que impacta negativamente sobre la protección. Esto redundo no solo en la necesidad de incrementar los tiempos de digestión (de 60 a 180 minutos), sino además anulando el efecto inicialmente descrito sobre la formación de agregados.

Por todo lo anterior podemos concluir que la modificación propuesta no es útil para los fines buscados. No obstante, habiendo demostrado la protección ejercida sobre la agregación inducida por acidez, el sorbitol pudiera eventualmente evaluarse como excipiente para la formulación de este tipo de medicamentos a un pH menor, en procura de extender su vida útil de estos productos.

Remoción selectiva de agregados en medicamentos policlonales inmunoterapéuticos mediante una etapa cromatográfica simple basada en una fase estacionaria monolítica: El impacto de la acidez requerida para el tratamiento con pepsina no solo es sobre el rendimiento del proceso sino además la calidad del producto. La presencia de agregados proteicos en este tipo de productos se asocia con la generación de efectos adversos tempranos (EAR) luego de su administración por vía parenteral, según un mecanismo aún no del todo dilucidado [26,27]. A pesar de ello, la eliminación completa de agregados no ha sido abordada en profundidad por los distintos productores, manifestando diferencias entre sus niveles incluso de lote a lote dentro del mismo productor [10,11,28]. Con el fin de reducir al mínimo posible los niveles de agregados proteicos en los productos finales, mediante un paso sencillo y con bajo impacto sobre los costos productivos, se decidió evaluar la aplicabilidad de una nueva generación de medios cromatográficos (monolíticos) con ligandos intercambiadores catiónicos fuertes (grupo sulfónico). Para ello se abordó un paneo inicial de condiciones mediante un diseño factorial 2^2 tomando dos factores (fuerza iónica y pH) en dos niveles, agregando además cuatro repeticiones de un punto central para asistir a la estimación de curvatura y brindar información sobre la dispersión de los resultados, según se señala en la siguiente tabla:

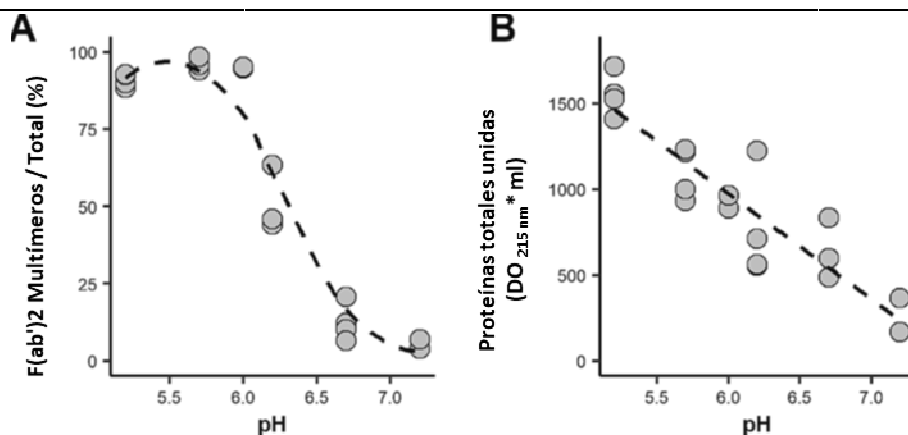
Variable sin codificar		Variable codificada
Conductividad (mS/cm)	pH	
8	6,2	-1
12	6,7	0
16	7,2	+1

Se tomaron muestras del frente de las corridas (material no retenido por la columna) y de los eluatos luego del paso de incremento brusco de la conductividad (material unido inicialmente a la columna). En estas fracciones se determinó la proporción de multímeros de F(ab')₂ en relación al total de especies de F(ab')₂ mediante SEC:



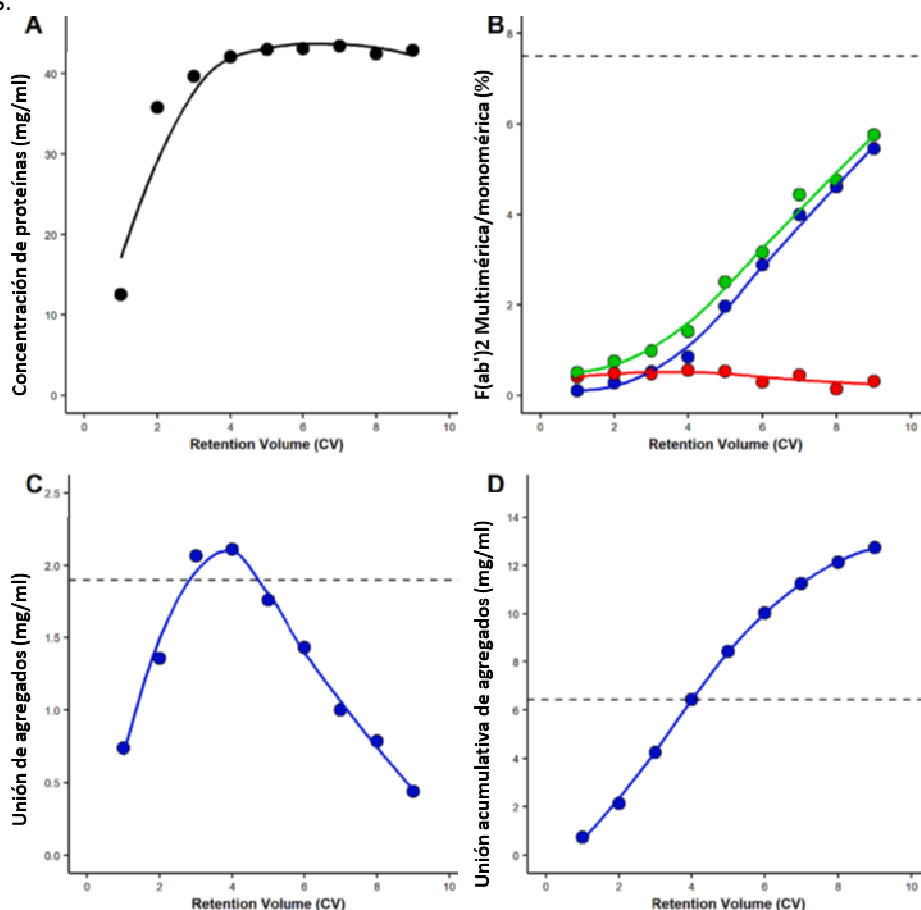
En los paneles A y B de la figura anterior se representa la distribución de especies multiméricas de F(ab')₂ en las muestras de material no unido a la columna cuando se modifica uno de los factores (pH en el panel A y fuerza iónica en el panel B) independientemente del otro factor (gráfico de componentes principales). Como se desprende del análisis de estos paneles, se observa un claro incremento de la presencia de especies multiméricas de F(ab')₂ con el incremento del pH, no observándose tan definido este efecto para el caso de la fuerza iónica. Los paneles C y D representan lo observado en su caso equivalente para las fracciones unidas a la columna. Nuevamente, se observa claramente un efecto del pH, que correlaciona con lo observado en las muestras de los frentes, esto es, el incremento en la proporción de especies multiméricas en el frente de las corridas muestra un detrimento paralelo en la proporción de estas isoformas que resultan retenidas por la columna. Considerando que el ligando presente en la fase estacionaria monolítica es un grupo sulfónico, este no ve modificada su carga en el intervalo de pH ensayado. "Puede interpretarse por lo tanto que las diferencias en la retención de las diferentes especies en este intervalo obedecen a un cambio en las cargas superficiales de las macromoléculas que están interactuando con la columna. Al tratarse esencialmente de isoformas de la misma molécula, las cuales se diferencian en el número de especies iguales que las componen (monómeros vs multímeros), los cambios observados en las retenciones relativas de estas con el pH no se deben a cambios en las proporciones de cargas superficiales con el pH sino en el número de cargas superficiales totales. La naturaleza convectiva del flujo a través de este tipo de columnas cromatográficas y la baja densidad de cargas superficiales en la fase estacionaria justifican la eficacia separativa observada en las mismas para este tipo de compuestos.

A continuación, en función del débil efecto observado en la fuerza iónica, en la siguiente ronda se decidió mantener ésta constante, en el orden de la esperada para formulaciones finales de antivenenos (16 mS/cm), analizando el efecto del pH sobre la fracción de especies multiméricas de F(ab')₂ retenidas. En la siguiente figura se representan los resultados obtenidos:



En la figura anterior se observa que si bien se incrementa la retención de proteínas por la fase estacionaria en forma aproximadamente lineal con el descenso del pH (panel B), por debajo de pH 6,0 la retención de F(ab')₂ permanece constante. Por lo tanto, por debajo de este último valor la el incremento de proteínas observado se debe a un incremento en la cantidad de F(ab')₂ monomérica, teniendo por lo tanto un efecto detrimental sobre el rendimiento.

En base a las observaciones anteriores, se seleccionó un valor de pH de 5,6 y se realizó un ensayo de estimación de la capacidad dinámica de unión de la columna para disponer de esta manera de parámetros de escalado. En la siguiente figura se representan los resultados observados, durante la inyección de 20 CV de muestra en la columna bajo las condiciones de trabajo optimizadas en etapas anteriores:



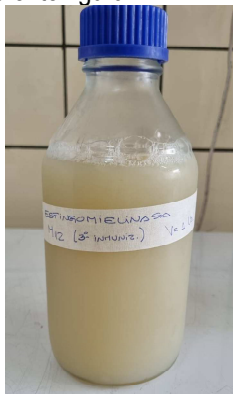
En el panel A de la figura anterior se representa la concentración de proteínas en el material no unido a la columna a lo largo de la corrida cromatográfica. Puede observarse que este se ve incrementado hasta alcanzar un amesetamiento a aproximadamente 4 CV desde la inyección. El panel B muestra el análisis por SEC de estas fracciones. Se observa que la proporción de especies diméricas de F(ab')₂ se mantiene constante a lo largo de la corrida, mientras que las especies con mayor grado de multimericidad va en

constante aumento. El panel C muestra como los agregados retenidos por volumen de fase estacionaria van creciendo hasta alcanzar una saturación luego de inyectadas cerca de 4 CV de muestra a la columna, momento a partir del cual comienza una etapa de pérdida de capacidad de unión de agregados. En el panel D se representa este último aspecto desde una perspectiva de la cantidad de agregados por unidad de volumen de fase estacionaria acumulados durante la corrida. La línea punteada muestra la proyección sobre el eje de las ordenadas del punto de saturación de la fase estacionaria (4CV), la cual equivale a 6.43 mg de agregados por ml de esta última, valor que se toma como DBC de la columna ensayada. Este valor puede luego ser utilizado como factor de escalado para su ensayo a escala piloto-productiva.

Se ha desarrollado de esta manera un paso sencillo y con un bajo costo de implementación para disminuir el contenido en los principales responsables de la generación de EAR en este tipo de medicamentos inmunoterapéuticos.

Disminución del contenido lipídico mediante el desarrollo de un proceso de precipitación selectiva con ácido octanoico: El proceso de producción tradicional realizado mediante esta plataforma tecnológica muestra frecuentemente una limitación en las operaciones unitarias basadas en el uso de membranas de filtración y ultrafiltración. Esto frecuentemente se observa para procesos en los cuales el material de partida posee una elevada carga lipídica, revelando la baja eficiencia de las etapas iniciales del proceso (digestión del plasma, tratamiento térmico y precipitación con sulfato de amonio) para la remoción de este grupo de compuestos. Como consecuencia, tanto la productividad como la calidad del producto final se ven seriamente afectados. El ácido octanoico o caprílico es utilizado en procesos biotecnológicos para la purificación de inmunoglobulinas por su alta capacidad y selectividad para precipitar componentes no-IgG del plasma. Su mecanismo de acción se basa en la asociación con las macromoléculas no-IgG (mayoritariamente Albúmina), agregación de estas al incrementar su hidrofobicidad superficial y finalmente separación de la mezcla por precipitación o sedimentación. En función de las observaciones anteriores se propuso evaluar el potencial de uso del ácido octanoico para, por medio de su interacción con moléculas de alta hidrofobicidad como los lípidos en suspensión, emplearlo como inductor de la precipitación de este tipo de compuestos y con ello su eliminación de los intermediarios y/o productos finales del proceso de producción bajo análisis.

Para ello, se seleccionaron dos intermediarios avanzados de proceso (denominados M12 y M13), los cuales se encontraban en la etapa inmediatamente anterior a su filtración final esterilizante. Los mismos presentaban signos claros de poseer un alto contenido lipídico según puede observarse dada su turbidez como se muestra en la siguiente figura:



Con el fin de corroborar la causa de esta turbidez se estudió el contenido de agregados proteicos en la fracción soluble de ambos intermediarios (mediante cromatografía de exclusión molecular), el contenido de proteínas totales y el contenido en lípidos seleccionados (colesterol mediante reacción enzimática acoplada a técnicas colorimétricas):

Proteínas totales:	Agregados / Fab'2:	Colesterol:
M12 3er Ciclo: 48,34 mg/ml	M12 3er Ciclo: 8,6 %	M12 3er Ciclo: 7,56 g/l
M13 3er Ciclo: 60,15 mg/ml	M13 3er Ciclo: 11,9 %	M13 3er Ciclo: 5,48 g/l

Los niveles de agregados que se observan son muy superiores a los deseables (máximo deseable 2%), un factor importante en términos de seguridad dado que los agregados son los principales responsables de EAR en este tipo de productos. Por otra parte, los niveles de colesterol, y por extensión de lípidos, se encuentran elevados incluso cuando se comparan con los correspondientes a plasmas de equinos normales, que se encuentran en el rango 0,77 a 1,38 g/l. La causa de este elevado contenido en material lipídico no resulta aún clara. Este tipo de comportamiento es ocasionalmente observado en algunos antivenenos, entendiéndose derivado de los efectos de algunas de las toxinas que los componen.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la turbidez que presentan los intermediarios de proceso pareciera deberse tanto a agregados proteicos como a material de origen lipídico. Con el fin de desarrollar la mencionada metodología basada en el uso de ácido octanoico, basados en la experiencia de nuestro grupo de trabajo y en la bibliografía específica, realizamos un abordaje basado en Diseño de Experimentos (DOE) sucesivos hasta alcanzar una condición optimizada de trabajo, empleando al intermediario de proceso M13 3er Ciclo como modelo. El diseño factorial ensayado fue el siguiente:

DOE 1:

Número de repeticiones	pH (codificada)	Ácido octanoico (codificada)	pH (unidades)	Ácido octanoico (ml/dl)
1	1	1	5	0,5
1	1	-1	5	0,1
1	-1	1	4,0	0,5
1	-1	-1	4,0	0,1
4	0	0	4,5	0,3

La temperatura de trabajo fue ambiente en todos los casos. Los resultados obtenidos fueron:

pH	Ácido octanoico	Turbidez	Agregados	Recuperación (Area Fab2 SEC)	Colesterol (g/l)
		++++	8,1%	NC	5,46
1	1	+	0,0%	9,9%	0,14
1	-1	+++	1,9%	69,2%	1,68
-1	-1	+++	0,0%	21,1%	0,22
-1	-1	+++	0,0%	83,1%	1,38
0	0	+	0,0%	89,0%	0,12
0	0	+	0,0%	86,2%	0,21
0	0	+	0,0%	87,3%	0,12
0	0	+	0,0%	66,6%	0,07

Los resultados de la Tabla indican que la condición de trabajo con ácido octanoico = 0,3 ml/dl y pH=4,5 nos permite obtener los menores valores tanto de turbidez como de agregados en solución y de colesterol residual, con una recuperación de aproximadamente 95% de los valores de F(ab')₂ en la muestra original. Tomando como punto de partida la anterior observación, se repitió el mismo diseño DOE para el intermediario de proceso M12, obteniéndose los siguientes resultados:

pH	Ácido octanoico	Turbidez	Agregados	Recuperación (Area Fab2 SEC)	Colesterol (g/l)
		++++	8,1%	NC	5,46
1	1	+	0,0%	9,9%	0,14
1	-1	+++	1,9%	69,2%	1,68
-1	-1	+++	0,0%	21,1%	0,22
-1	-1	+++	0,0%	83,1%	1,38
0	0	+	0,0%	89,0%	0,12
0	0	+	0,0%	86,2%	0,21
0	0	+	0,0%	87,3%	0,12
0	0	+	0,0%	66,6%	0,07

Nuevamente, la condición de trabajo ácido octanoico=0,3 ml/dl, pH=4,5 nos permitió obtener los mejores resultados. Podemos luego concluir que esta metodología sencilla permite, al menos para el caso de intermediarios avanzados de proceso, se puede alcanzar una alta reducción tanto en el contenido lípidos como en el de agregados proteicos, permitiendo de esta manera no solamente obtener productos de mayor calidad, sino con un alto potencial de reducir los requerimientos de uso de membranas para clarificación y filtración de los mismos. De acuerdo con los resultados preliminares de ensayos actualmente en curso y que se esperan aplicar durante un nuevo proyecto aprobado por este mecanismo de financiación, se espera poder desarrollar una modificación de una de las etapas iniciales de proceso mediante la introducción de una etapa de precipitación ácido octanoico que permita reducir el contenido lipídico en etapas tempranas de proceso. De esta manera se espera poder reducir las necesidades de uso de membranas de filtración y ultrafiltración en un mayor número de etapas del proceso.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

Nuestra investigación ha abierto varias líneas de trabajo futuro. En primer lugar, la adición de sorbitol a pesar de resultar detrimental para su empleo en las etapas iniciales del proceso productivo, ha demostrado ser un eficiente protector frente a la formación de agregados en condiciones de acidez. No obstante, el uso de condiciones ácidas puede ser beneficioso para extender la vida útil de este tipo de formulaciones medicamentosas. Por lo tanto el sorbitol podría ser ensayado para mantener la estabilidad de las moléculas de F(ab')₂ en forma monomérica en estas condiciones.

Por otra parte, el ácido octanoico ha mostrado ser eficiente no solo en la disminución en los niveles de lípidos sino además en el contenido agregados de intermediarios de proceso en sus etapas finales. Su aplicación a etapas tempranas del proceso está siendo actualmente estudiada por nuestro grupo de trabajo, formando parte de las actividades de un proyecto recientemente aprobado en la última convocatoria PICDyT.

6. Bibliografía (min. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

- [1] Squaiella-Baptistão, Sant'Anna, et al., The history of antivenoms development: Beyond Calmette and Vital Brazil, *Toxicon* 150 (2018) 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.008>.
- [2] Pope, The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action., *Br. J. Exp. Pathol.* 20 (1939) 201–212.
- [3] Harms, The purification of antitoxic plasmas by enzyme treatment and heat denaturation., *Biochem. J.* 42 (1948) 390–397. <https://doi.org/10.1042/bj0420390>.
- [4] Jackson and Wunner, *Rabies*, Academic Press Inc., 2003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-379077-4.X5000-7>.
- [5] Carballal and Oubiña, *Virología Médica*, 4th ed., Corpus Libros, 2015.
- [6] Ministerio de Salud de la Nación, *Guía para la prevención, vigilancia y control de la rabia en*

- Argentina, Buenos Aires, Argentina, 2018.
- [7] Luekrajang, Wangsai, et al., Production of antirabies serum of equine origin, in: F. Meslin, M. Kaplan, H. Koprowski (Eds.), Lab. Tech. Rabies., 3rd ed., Geneva, 1996: pp. 401–404.
 - [8] Walls, Park, et al., Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, *Cell* 181 (2020) 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
 - [9] González Viacava, Varese, et al., Immune Maturation Effects on Viral Neutralization and Avidity of Hyperimmunized Equine Anti-SARS-CoV-2 Sera, *Antibodies* 11 (2022) 3–11. <https://doi.org/10.3390/antib11010003>.
 - [10] Zurbano, Tavarone, et al., Critical aspects on traditional antivenom production processes and their optimization by factorial analysis, *Biologicals* 68 (2020) 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.08.005>.
 - [11] Squaiella-Baptista, Marcelino, et al., Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab')₂ antivenoms, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90 (2014) 574–584. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0591>.
 - [12] World Health Organization, Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, (2017) 197–388.
 - [13] Kyong, Sung, et al., Acid stability of anti-Helicobacter pylori IgY in aqueous polyol solution, *J. Biochem. Mol. Biol.* 35 (2002) 488–493. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.5.488>.
 - [14] Al-Abdulla, Garnvwa, et al., Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*), *Toxicon* 42 (2003) 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00170-3).
 - [15] Evans, Removing Aggregates in Monoclonal Antibody Purification, *Pharm. Technol.* 39 (2015) 72–74.
 - [16] Shukla, Hubbard, et al., Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 848 (2007) 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.026>.
 - [17] Ghose, Tao, et al., Purification of monoclonal antibodies by hydrophobic interaction chromatography under no-salt conditions, *MAbs* 5 (2013) 795–800. <https://doi.org/10.4161/mabs.25552>.
 - [18] Chen, Tetrault, et al., Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.083>.
 - [19] Xu, Li, et al., Process development for robust removal of aggregates using cation exchange chromatography in monoclonal antibody purification with implementation of quality by design, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42 (2012) 183–202. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.654572>.
 - [20] Ng, Jacinto, et al., Improving Aggregate Removal from a Monoclonal Antibody Feedstream Using High-Resolution Cation Exchange Chromatography, (2000) 0–3.
 - [21] Gagnon and Beam, Antibody Aggregate Removal by Hydroxyapatite Chromatography, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2009) 440–446. <https://doi.org/10.2174/138920109788488833>.
 - [22] Aoyama, Matsumoto, et al., Application of novel mixed mode chromatography (MMC) resins having a hydrophobic modified polyallylamine ligand for monoclonal antibody purification, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1191 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123072>.
 - [23] Chen, Tetrault, et al., The distinctive separation attributes of mixed-mode resins and their application in monoclonal antibody downstream purification process, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.047>.
 - [24] Josic, Separation of Peptides and Proteins, in: F. Svec, T. Tennikova, Z. Deyl (Eds.), *Monolith. Mater.*, Elsevier B.V., Amsterdam, 2003: pp. 389–411.
 - [25] Rajamanickam, Herwig, et al., Monoliths in Bioprocess Technology, *Chromatography* 2 (2015) 195–212. <https://doi.org/10.3390/chromatography2020195>.
 - [26] León, Herrera, et al., Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms, *Toxicon* 76 (2013) 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010>.
 - [27] Stone, Isbister, et al., Immune Response to Snake Envenoming and Treatment with Antivenom; Complement Activation, Cytokine Production and Mast Cell Degranulation, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002326>.