

# Optimización del Proceso de Fabricación de Antivenenos: Incrementando la Pureza con Eficiencia Productiva

Aline Andrade Martins

Laboratorio de Desarrollo de Productos  
Biológicos

Fundação Ezequiel Dias

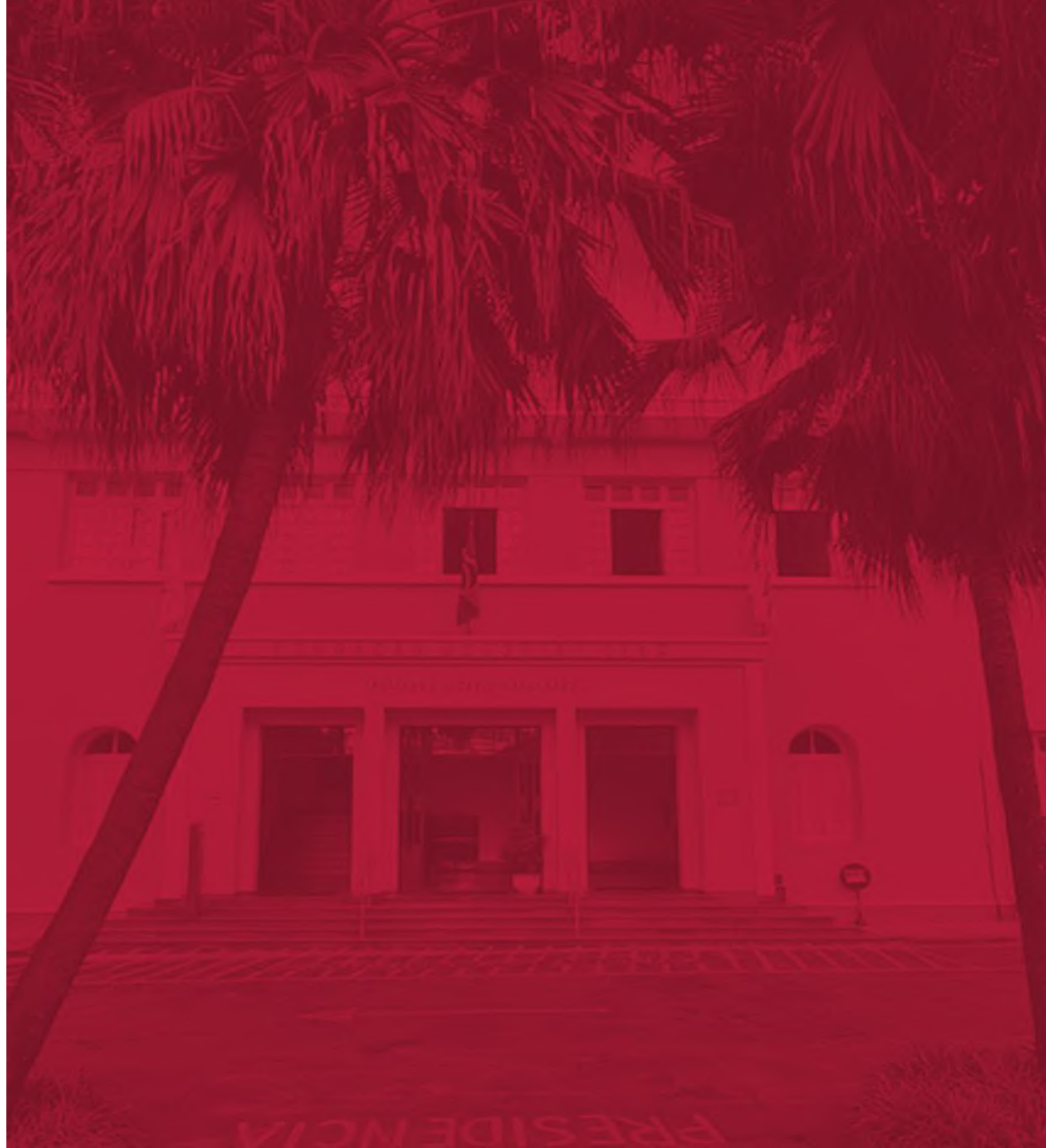


SAÚDE



MINAS  
GERAIS

GOVERNO  
DIFERENTE.  
ESTADO  
EFICIENTE.



# INTRODUCCIÓN

Muchas reacciones adversas son causadas por el uso de antivenenos.

La ocurrencia de estas reacciones se ve agravada por la presencia de proteínas no inmunoglobulinicas, fragmentos proteicos de bajo peso molecular resultantes de la digestión enzimática y agregados proteicos.

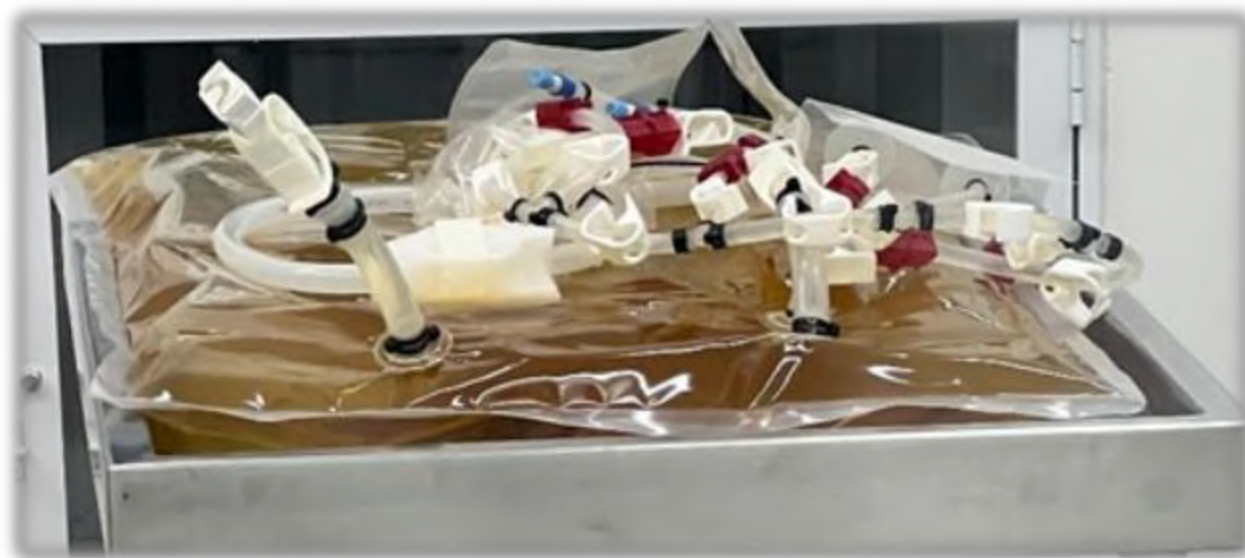
Un proceso de purificación adecuadamente desarrollado puede eliminar estos contaminantes y, en consecuencia, reducir las reacciones adversas causadas por los antivenenos.

# OBJETIVO

Optimizar el proceso de purificación de los antivenenos de la Funed de manera cumplir los parámetros de pureza de lo Guía de la Organización Mundial de la Salud sobre la producción y el control de antivenenos, sin que haya pérdida de rendimiento, es decir, sin reducción del número de ampollas por litro de plasma.

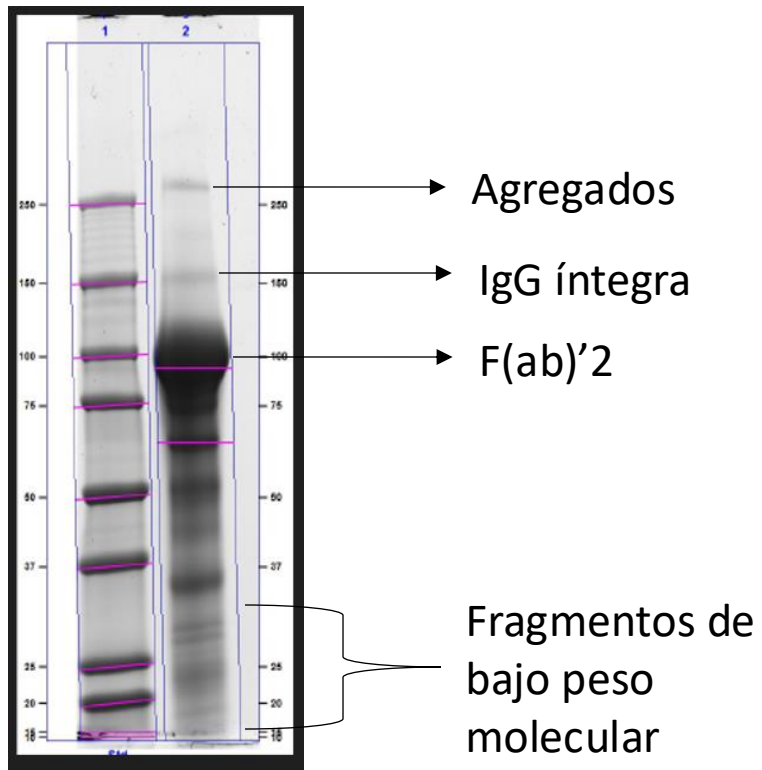
# PROCESO PRODUCTIVO ACTUAL







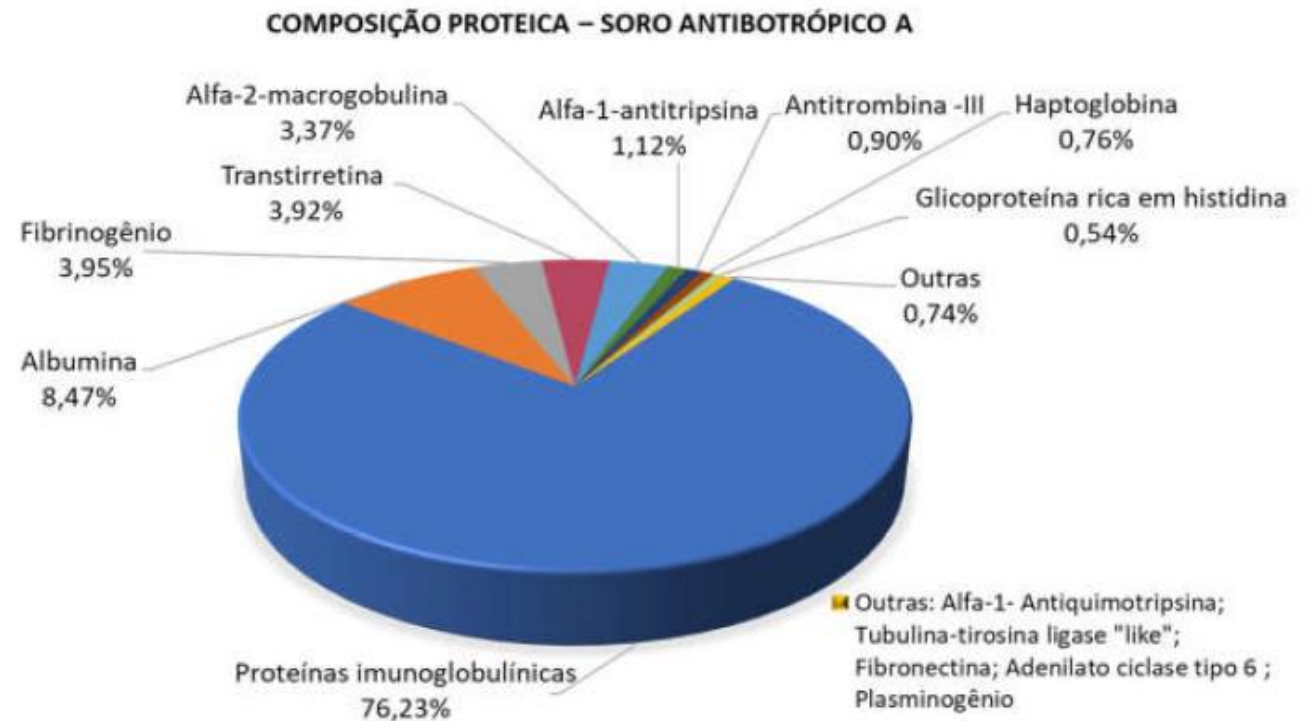
# PROCESSO PRODUTIVO ATUAL



**Figura 1:** SDS-PAGE gradiente 4 a 15%

1: Estándar de peso molecular; 2: antiveneno Bothrópico Funed

**Fuente:** Funed, 2023

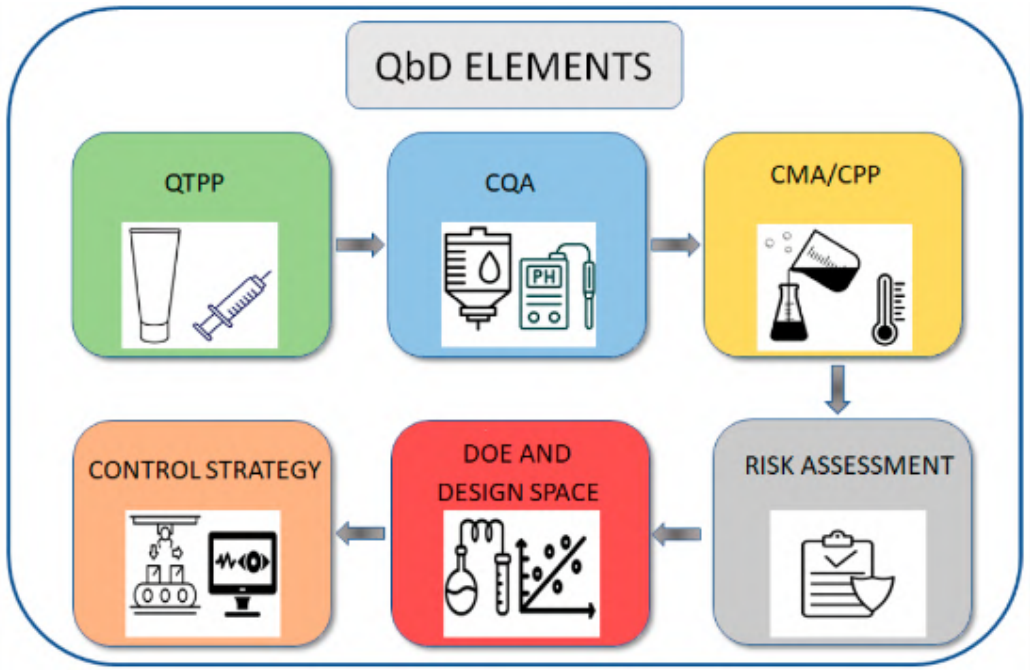


**Figura 2:** Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*

**Fuente:** Funed, 2024

# ETAPAS DEL DESARROLLO

## Abordaje Quality by design (QbD)

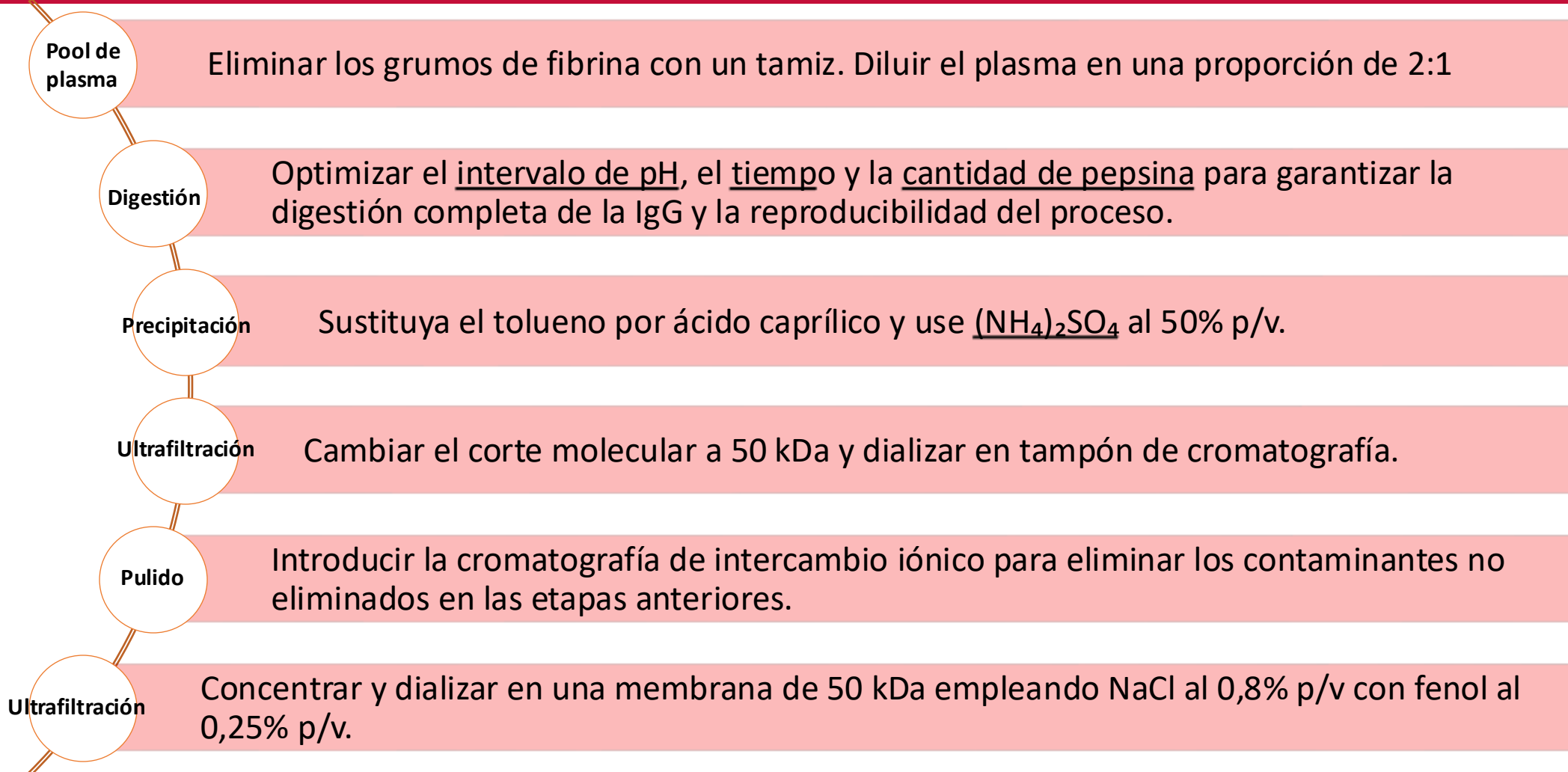


**Figura 3:** Elementos del Quality by design (QbD)  
**Fuente:** <https://vecteezy.com> (accessed on 23 September 2023)

**Tabla 1:** QTPP IFA de antiveneno Bothrópico

Requisito	Especificación/objetivo
Forma farmacéutica	Solución
Forma de presentación	Single Use Bag con $\cong$ 30 L
Utilización prevista	Preparación de antiveneno para tratar a pacientes ofendidos por serpientes del género Bothrops sp.
Potencia	$\geq$ 5 mg/ml
Pureza	<b>Proteínas de inmunoglobulina</b> - mínimo 90% determinado por electroforesis en condiciones reductoras; <b>Albúmina</b> - máximo 1% determinado por electroforesis en condiciones reductoras; Agregados solubles - ausencia determinada por electroforesis en condiciones no reductoras.
Pureza microbiológica	$\leq$ 10 UFC/ml; No Virus
Rendimiento	Igual o superior al producto de la condición actual

# PROPUESTAS DE MEJORA DEL PROCESO PRODUCTIVO



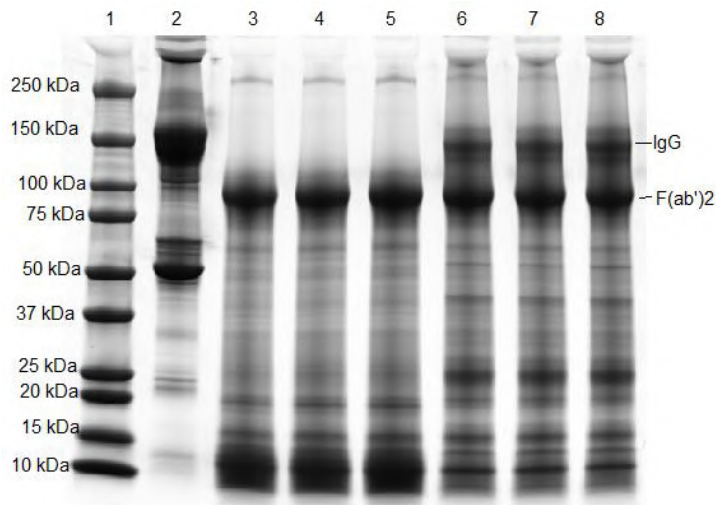


# REMOCIÓN DE AGREGADOS DE FIBRINA

Tabla 2: Resultados de muestras de experimentos en triplicado del Pool de Plasma con y sin agregados de fibrina

Experimento	Pool de Plasma	pH después de añadir pepsina y ajustar a 2,8	pH tras tiempo de digestión	[ ] proteínas (mg/ml)	% banda de 150 kDa (IgG)
1	Sin agregados	2,80	2,96	37,5	0
2		2,81	2,99	39,67	0
3		2,80	3,00	37,9	0
4	Con agregados	2,81	3,49	64,99	13,8
5		2,81	3,44	70,72	13,2
6		2,80	3,53	75,67	17,8

Figura 4: SDS-PAGE de las soluciones tras la digestión en los 6 ensayos



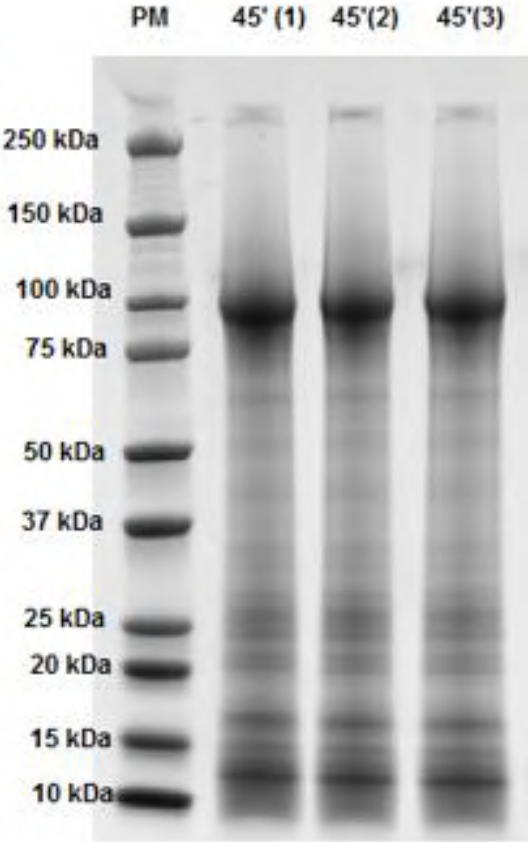
**Leyenda:** 1) Estándar de peso molecular;  
2) Pool de Plasma;  
3, 4 e 5) Pool de Plasma sin agregados triplicados;  
6, 7 e 8) Pool de Plasma con agregados triplicados.

# DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Diseño experimental: Diseño Compuesto Central Rotacional  
Total de 14 experimentos

Variables analizadas	Niveles (mínimo y máximo)	Respuesta a la planificación experimental
pH	2,6 a 3,0	1- % de IgG íntegra 2- % de F(ab') <sub>2</sub>
Duración de la digestión	45 minutos; 120 minutos	

- Parámetros fijos:
- Cantidad de pepsina: 75 U/g de proteína
  - Temperatura: 25°C
  - Agitación: 150 rpm

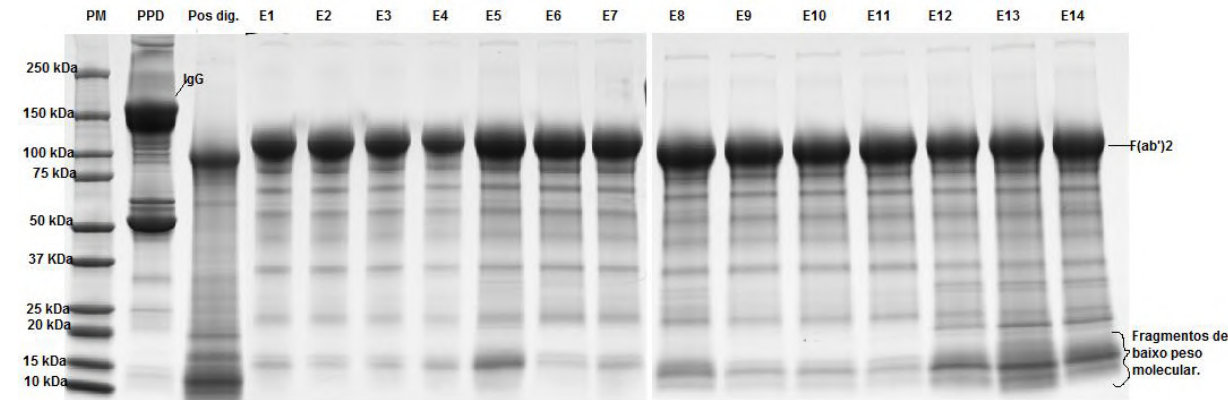
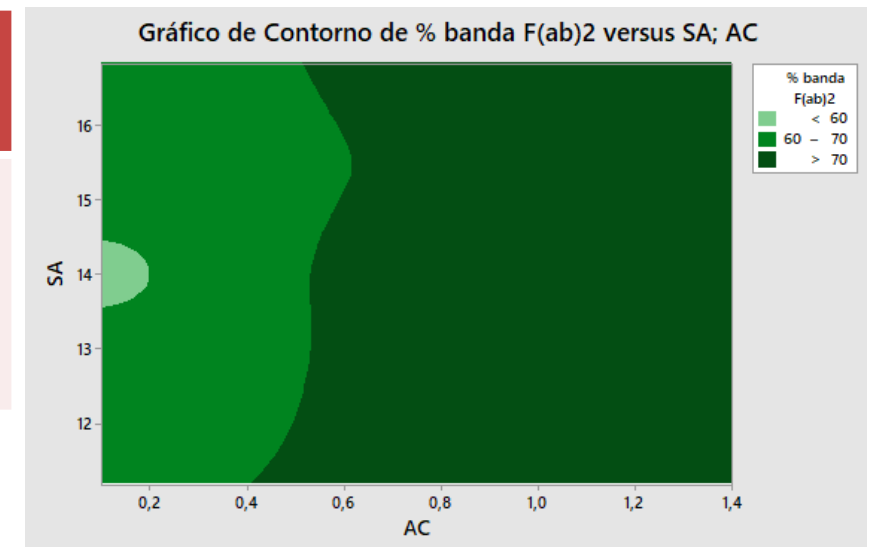


**Figura 5:** SDS-PAGE  
Condición elegida: 45 minutos pH: 2,8 a 2,9

# PRECIPITACIONES

Diseño experimental: Diseño Compuesto Central Rotacional  
Total de 14 experimentos

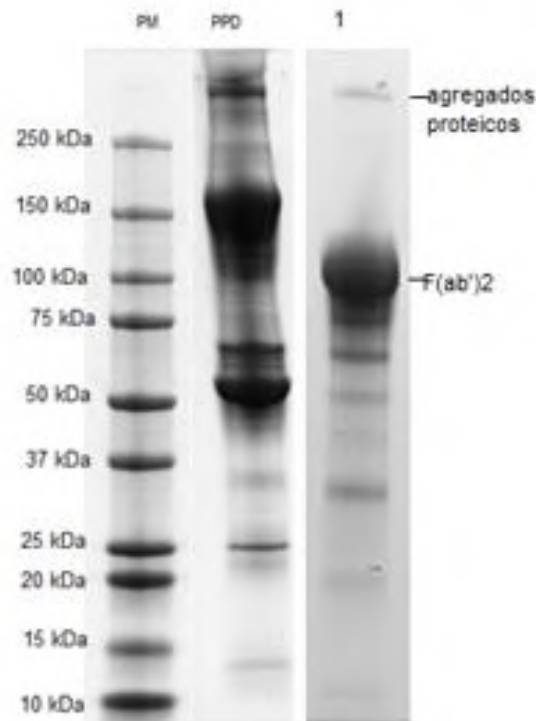
Variables analizadas	Niveles (mínimo y máximo)	Respuesta a la planificación experimental
[ ] ácido caprílico	0,3 al 1,2 %	1- % relativo de concentración de F(ab') <sub>2</sub>
[ ] (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12 al 16 %	2- Rendimiento del proceso



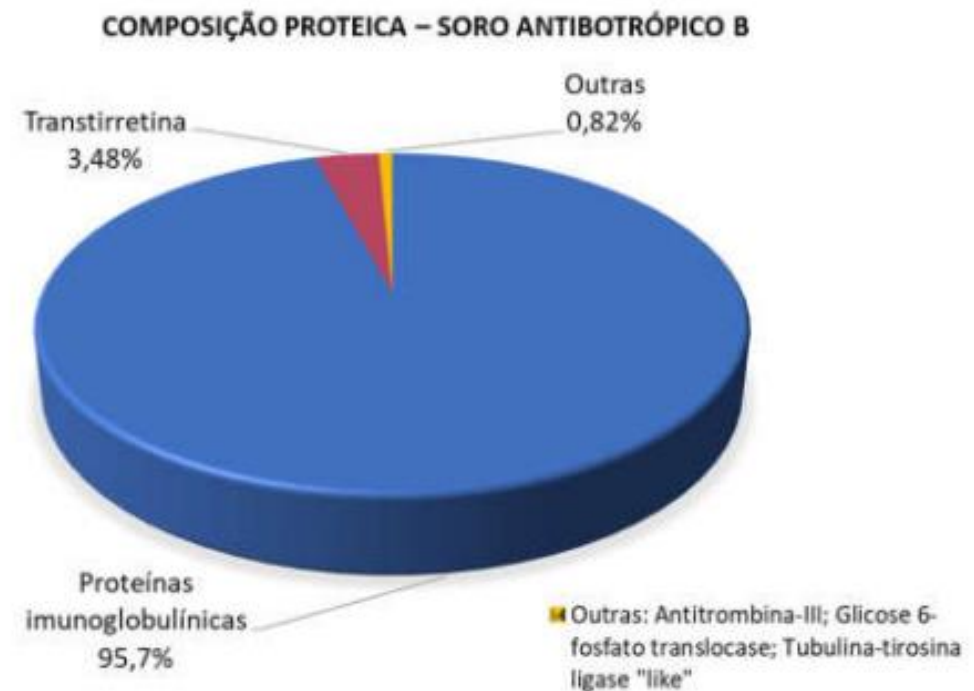
**Condición elegida:**  
ácido caprílico al 0,6% y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 12%

# PRECIPITACIONES

## Resultados de pureza tras la optimización



**Figura 8:** SDS-PAGE gradiente 4 al 15%  
**Fuente:** Funed, 2023



**Figura 9:** Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*  
**Fuente:** Funed, 2024

# PULIDO CROMATOGRÁFICO

- **Cromatografía de intercambio aniónico fuerte**

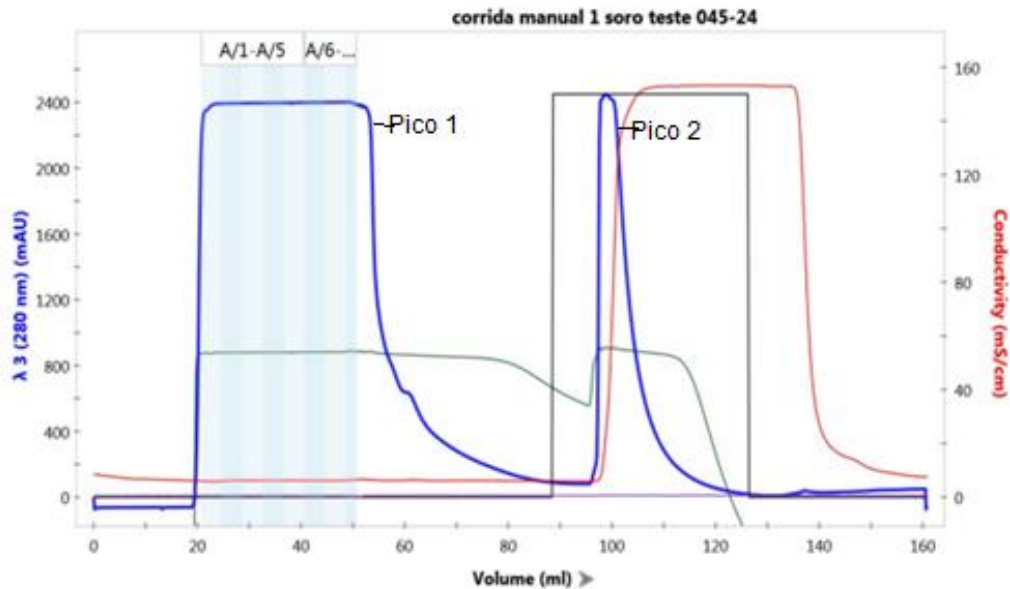
Parámetros:

- Equipo: Cromatógrafo líquido modelo NGC™ Chromatography System Quest™ 10 Plus;
- Columna: Hitrap QXL 5ml (intercambio aniónico fuerte);
- pH da corrida: 6,3;
- Flujo: 3 mL/min;
- Tampón de equilibrio (A): Fosfato 0,07 M
- Tampón de elución (B): Fosfato 0,07 M + NaCl 2M.



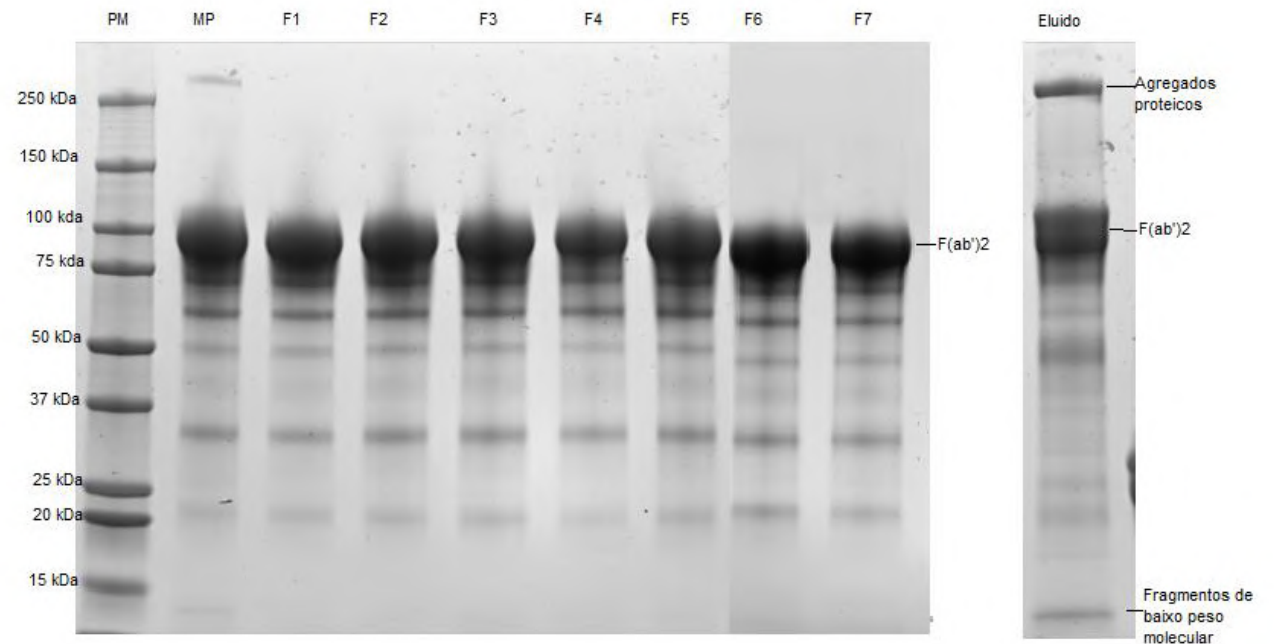
# PULIDO CROMATOGRÁFICO

- Cromatografía de intercambio aniónico fuerte



**Figura 10:** Cromatograma del antiveneno Bothrópico

**Fuente:** Funed, 2024



**Figura 11:** SDS-PAGE gradiente 4 al 15%

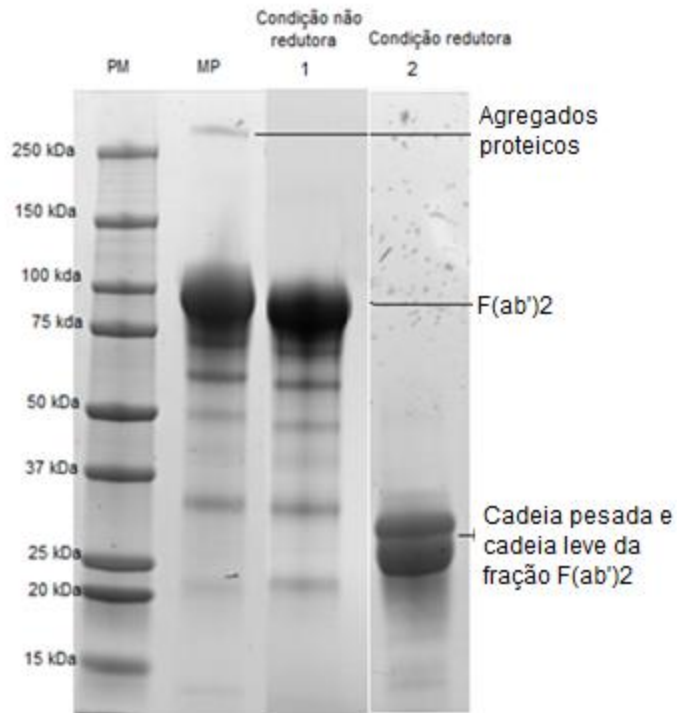
MP: material de partida;

F1 a F7: fracciones del *flowthrough*

**Fuente:** Funed, 2024

# PULIDO CROMATOGRÁFICO

## Resultado de la pureza después de cromatografía



**Figura 12:** SDS-PAGE de antiveneno con proceso optimizado con pulido cromatográfico en la condición no reductora y en la condición reductora

### COMPOSIÇÃO PROTEICA – SORO ANTIBOTRÓPICO C

Adenilato ciclase tipo 6 e Tubulina-tirosina ligase "like"

0,2 %



Proteínas imunoglobulínicas  
99,8 %

**Figura 13:** Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*

**Fuente:** Funed, 2024

# POLIMENTO CROMATOGRÁFICO

## Resultado del rendimiento después de cromatografía

Experimento	Situación actual del antiveneno	Antiveneno Optimizado
Actividad específica	0,1955	0,2853
Rendimiento en comparación con la potencia del plasma	23,94%	41,12%

# CONCLUSIÓN

La optimización del proceso alcanzó el objetivo propuesto.

El producto cumplió con el QTPP, superando los criterios establecidos de pureza y rendimiento.

Pureza: 99,8 %

Rendimiento: 1,72 veces superior al producto actual

# PERSPECTIVAS PARA 2025

Reproducir el proceso a escala industrial con 3 lotes de ingeniería;

Evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en laboratorio.





GRACIAS!

