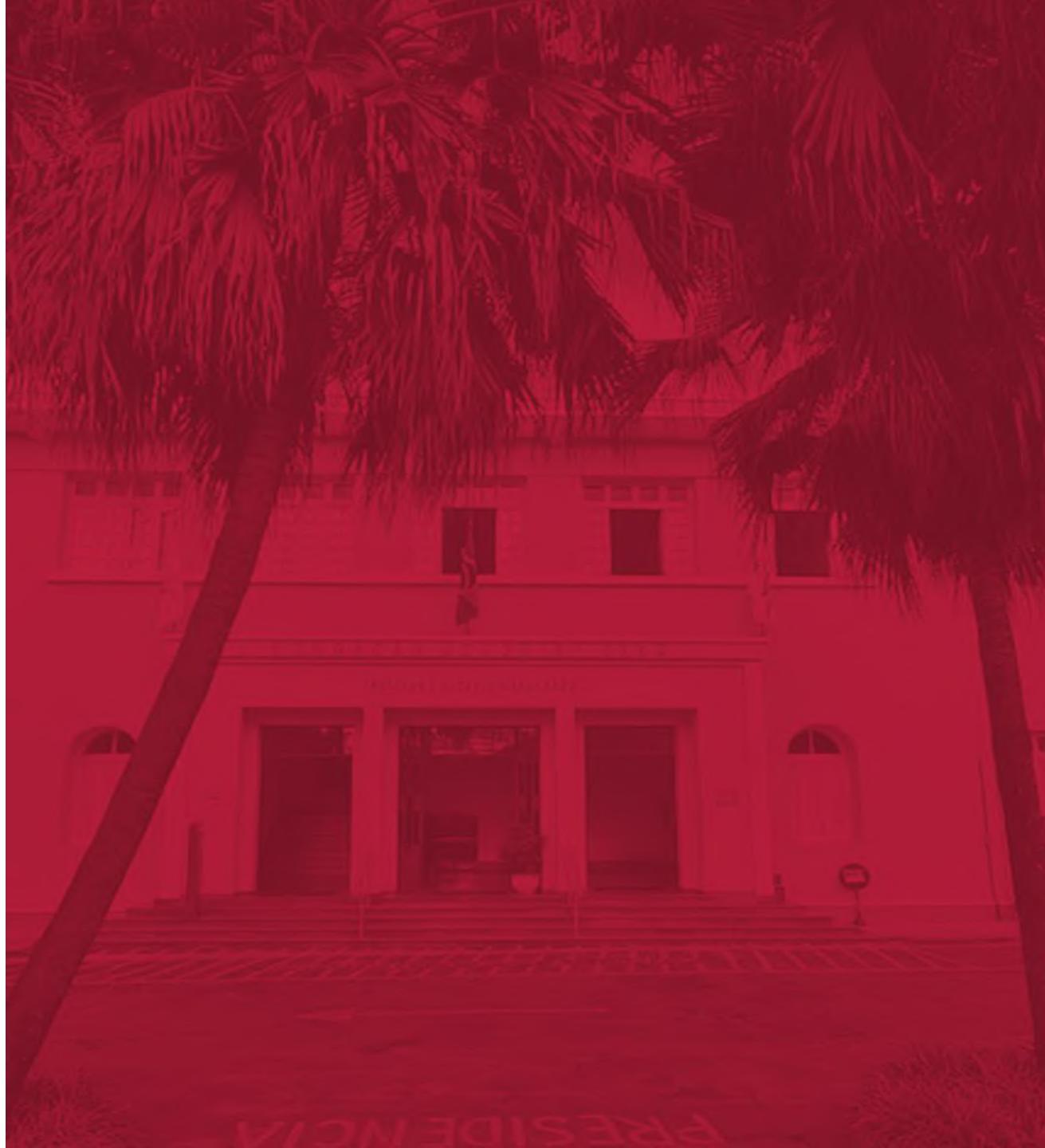


Optimización del Proceso de Fabricación de Antivenenos: Incrementando la Pureza con Eficiencia Productiva

Aline Andrade Martins

Laboratorio de Desarrollo de Productos Biológicos

Fundação Ezequiel Dias



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 inmunoglobulininas, 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

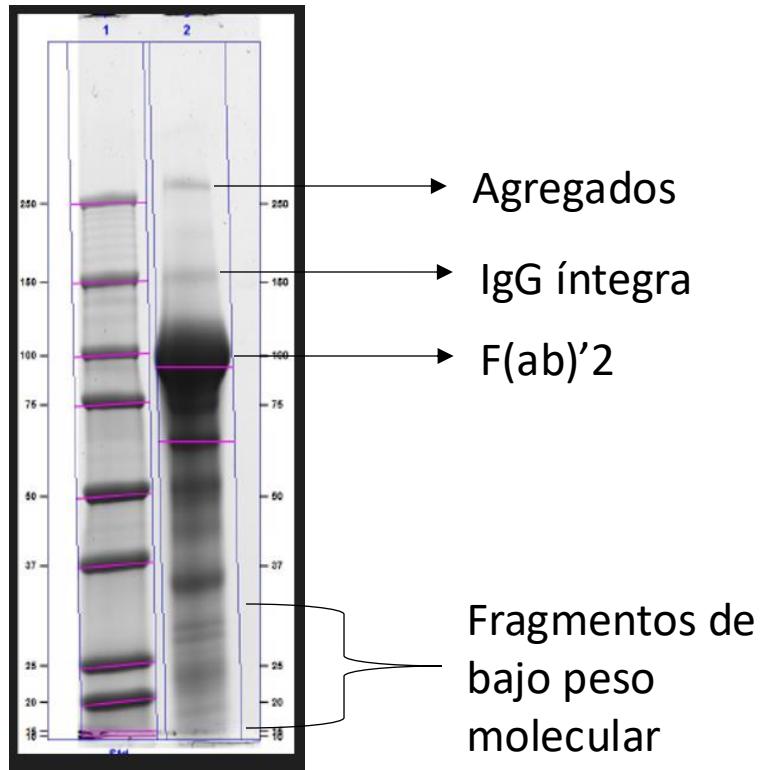


Figura 1: SDS-PAGE gradiente 4 a 15%
1: Estándar de peso molecular; 2: antiveneno Bothrópico Funded
Fuente: Funded, 2023

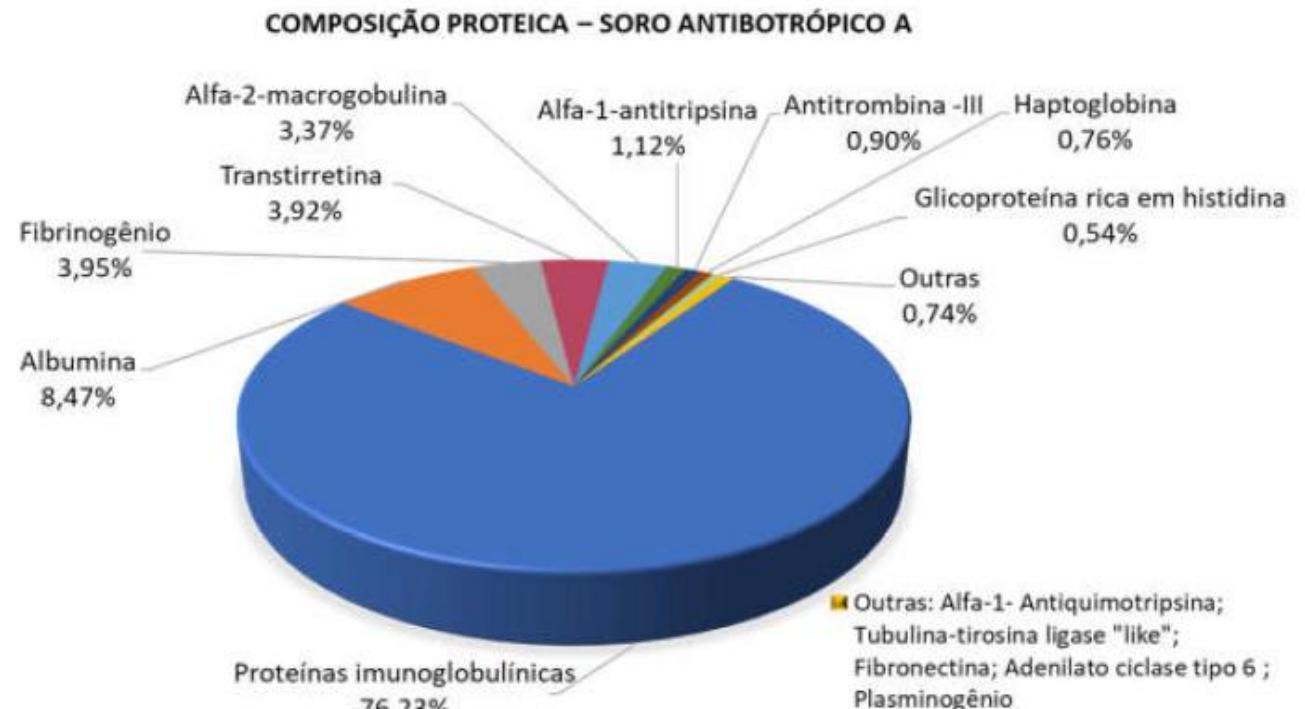


Figura 2: Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*
Fuente: Funded, 2024

ETAPAS DEL DESARROLLO

Abordaje Quality by design (QbD)

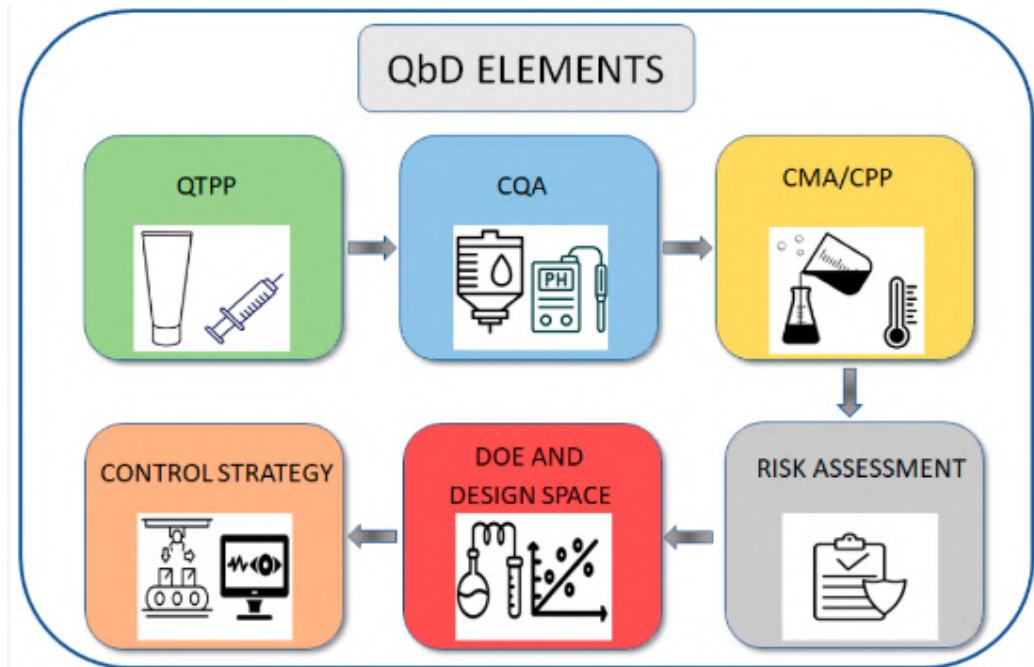


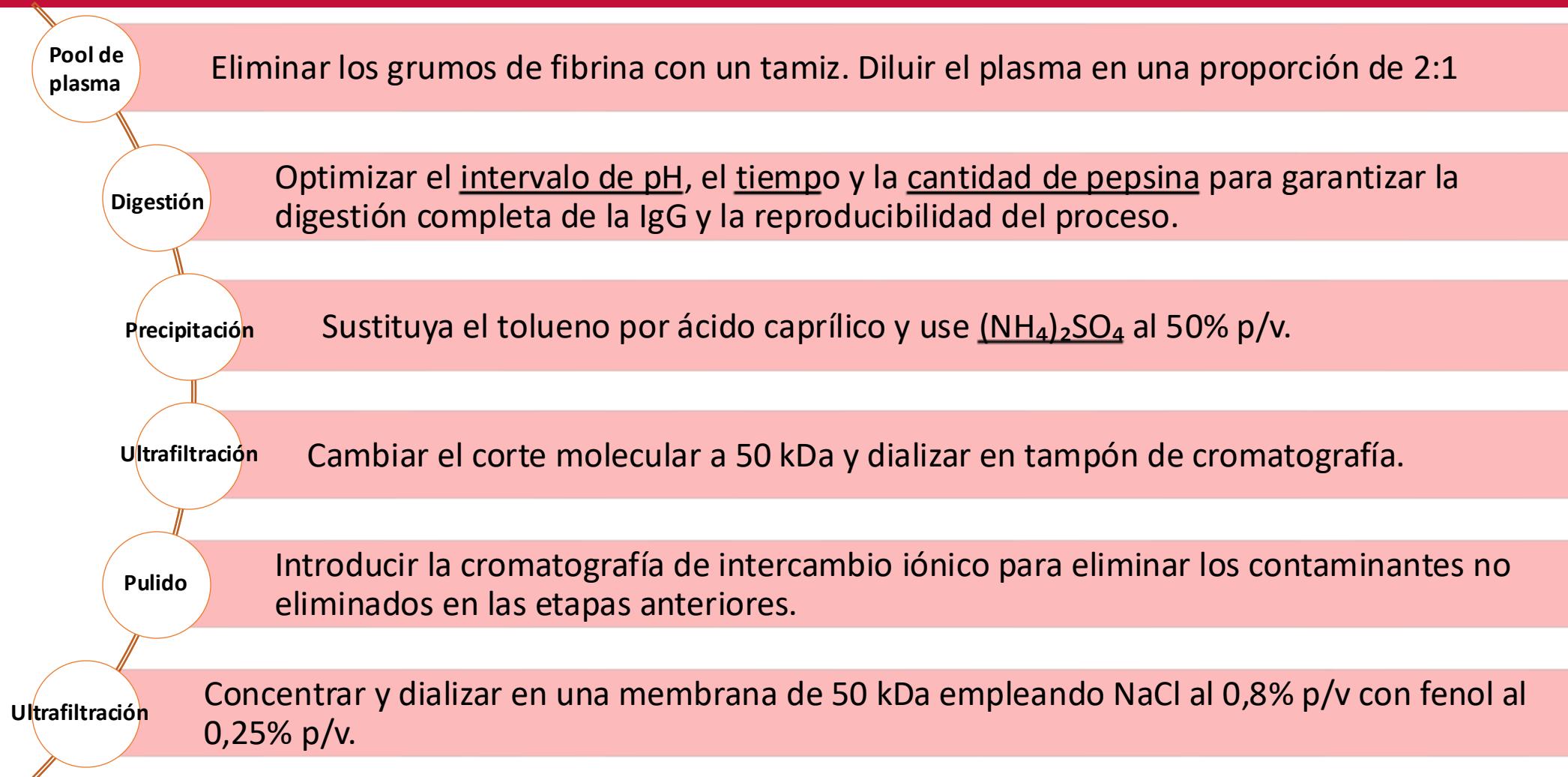
Figura 3: Elementos del Quality by design (QbD)

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 ≥ 30 L
Utilización prevista	Preparación de antiveneno para tratar a pacientes ofendidos por serpientes del género Bothrops sp.
Potencia	≥ 5 mg/ml
Pureza	Proteínas de inmunoglobulina - mínimo 90% determinado por electroforesis en condiciones reductoras; Albúmina - máximo 1% determinado por electroforesis en condiciones reductoras; Agregados solubles - ausencia determinada por electroforesis en condiciones no reductoras.
Pureza microbiológica	≤ 10 UFC/ml; No Virus
Rendimiento	Igual o superior al producto de la condición actual

PROPUESTAS DE MEJORA DEL PROCESO PRODUCTIVO

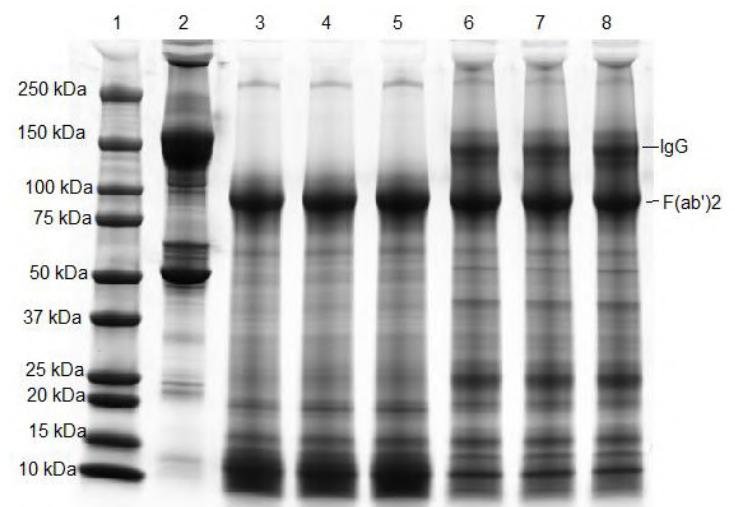


REMOCIÓN DE AGREGADOS DE FIBRINA

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
Duración de la digestión	45 minutos; 120 minutos	2- % de F(ab')2

Parámetros fijos:

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

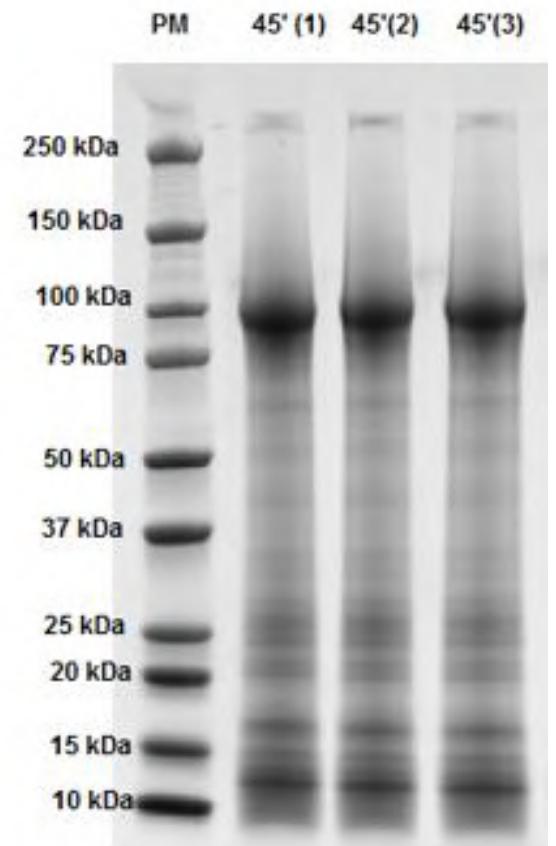


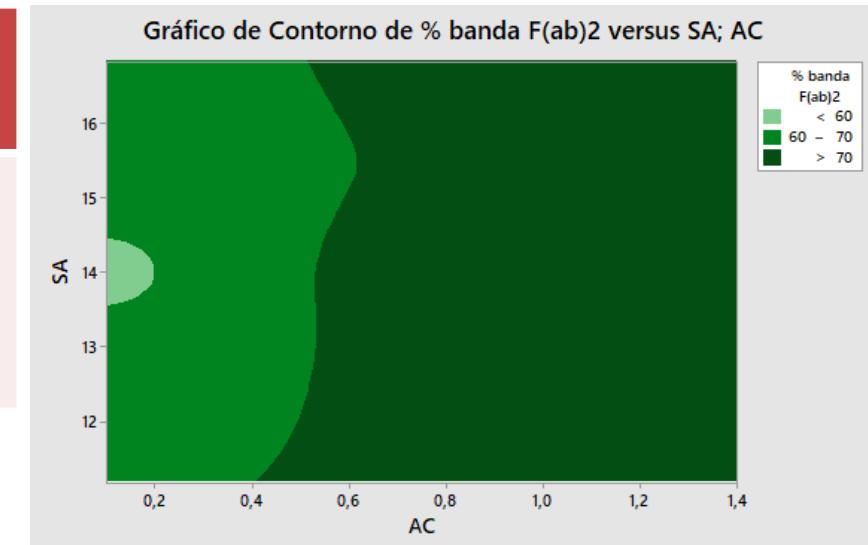
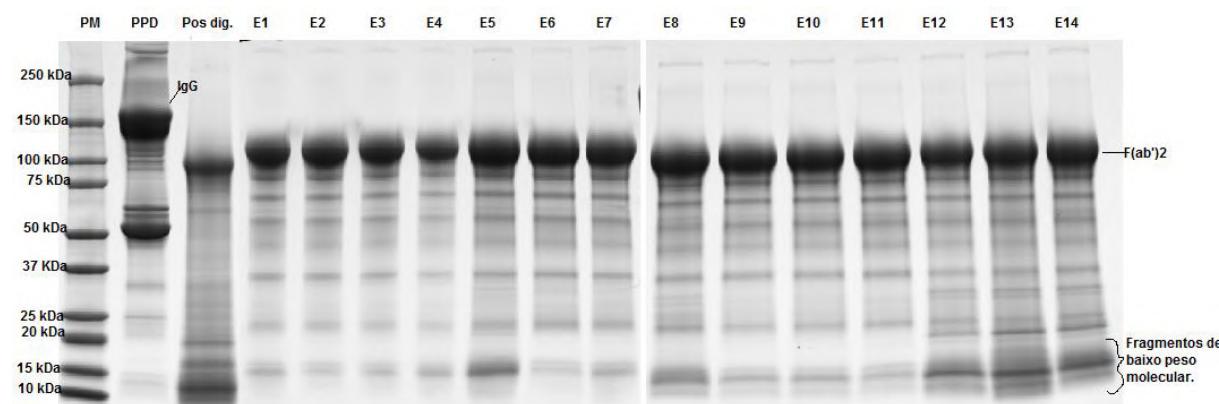
Figura 5: SDS-PAGE

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')2
[] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12 al 16 %	2- Rendimiento del proceso



Condición elegida:
ácido caprílico al 0,6% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 12%

PRECIPITACIONES

Resultados de pureza tras la optimización

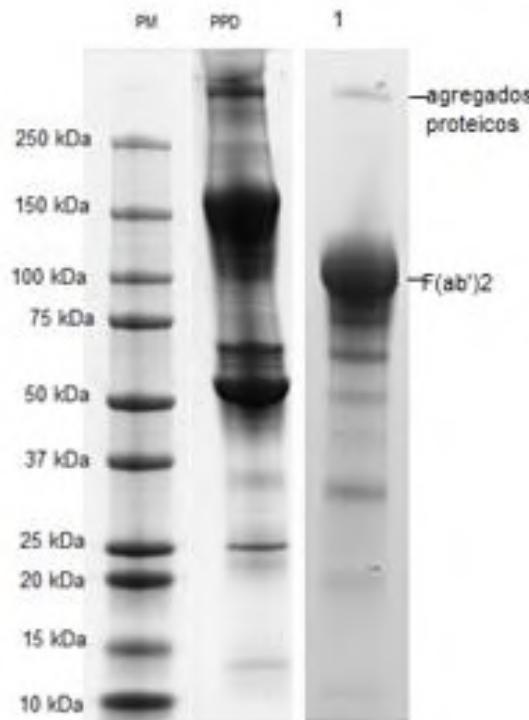


Figura 8: SDS-PAGE gradiente 4 al 15%
Fuente: Funed, 2023

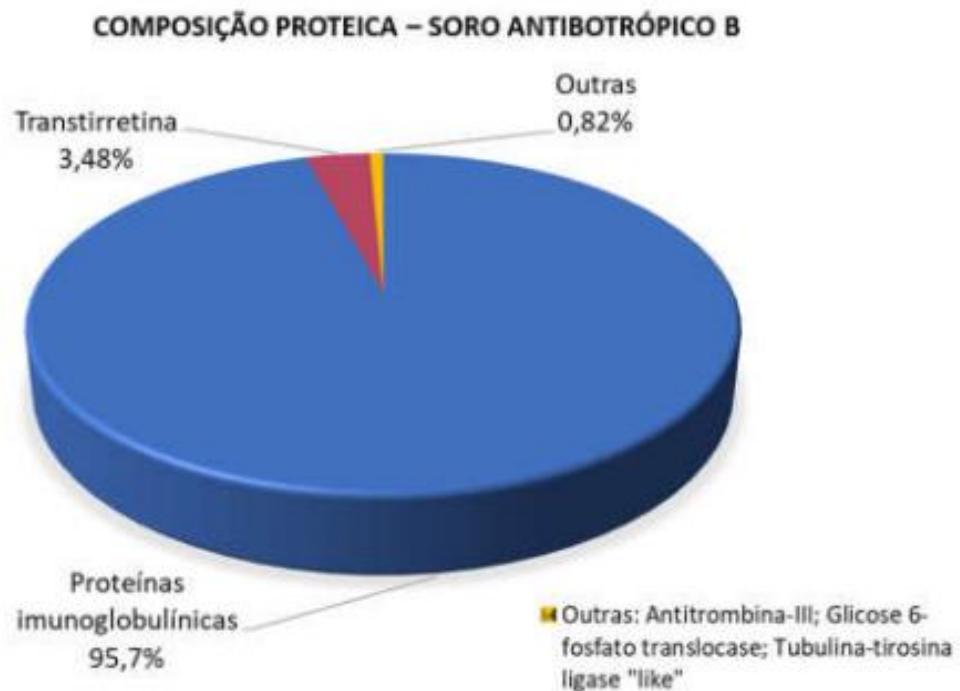


Figura 9: Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*
Fuente: Funed, 2024

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

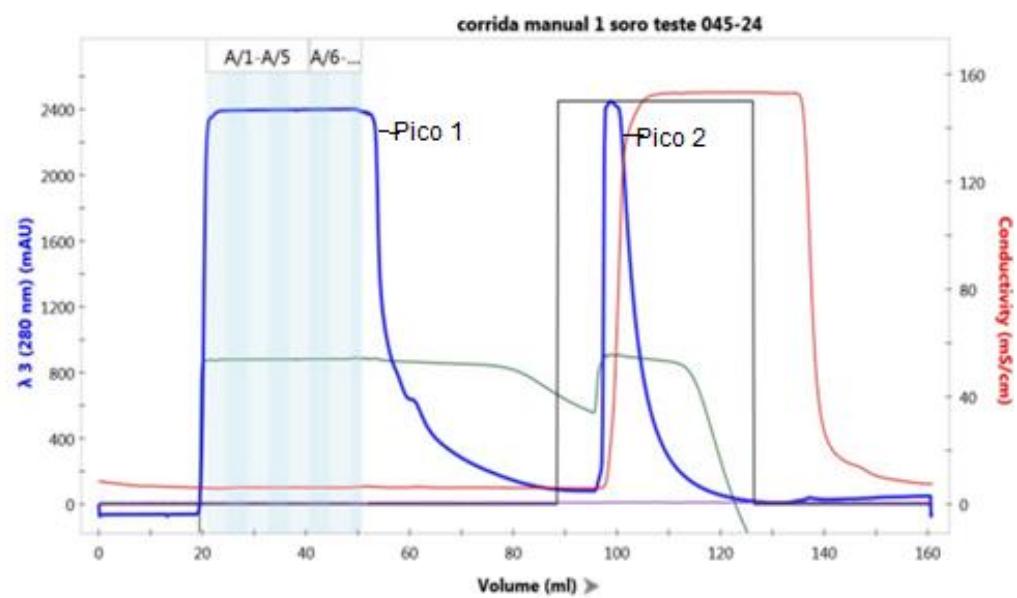


Figura 10: Cromatograma del antiveneno Bothrópico
Fuente: Funed, 2024

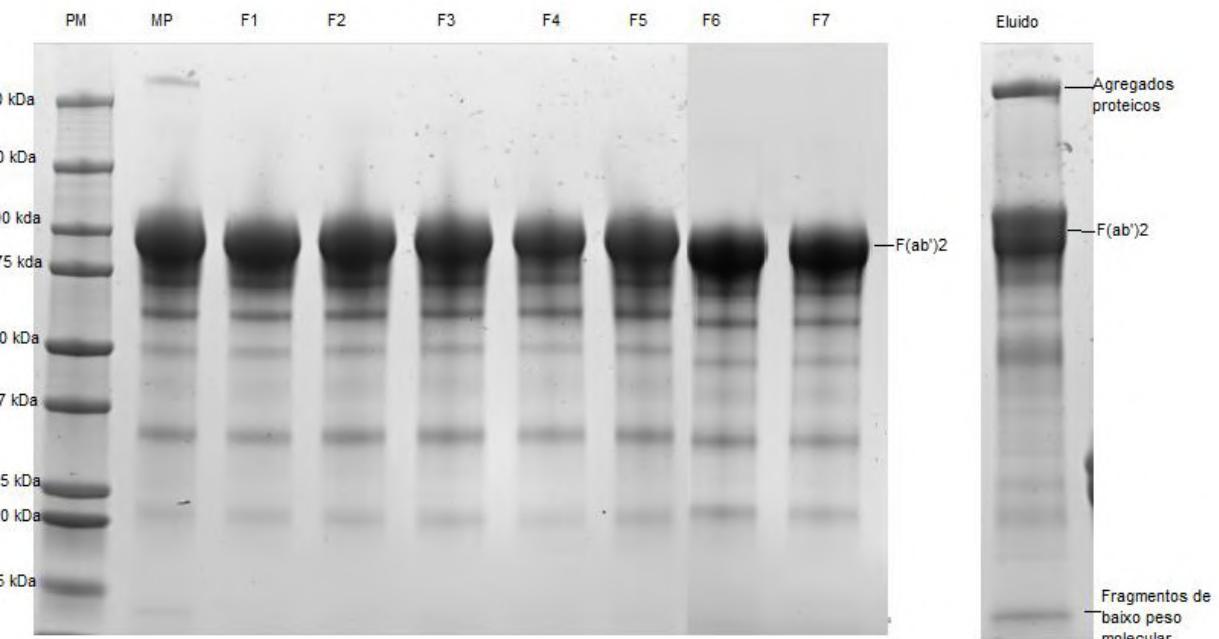


Figura 11: SDS-PAGE gradiente 4 al 15%
MP: material de partida;
F1 a F7: fracciones del *flowthrough*
Fuente: Funed, 2024

PULIDO CROMATOGRÁFICO

Resultado de la pureza después de cromatografía

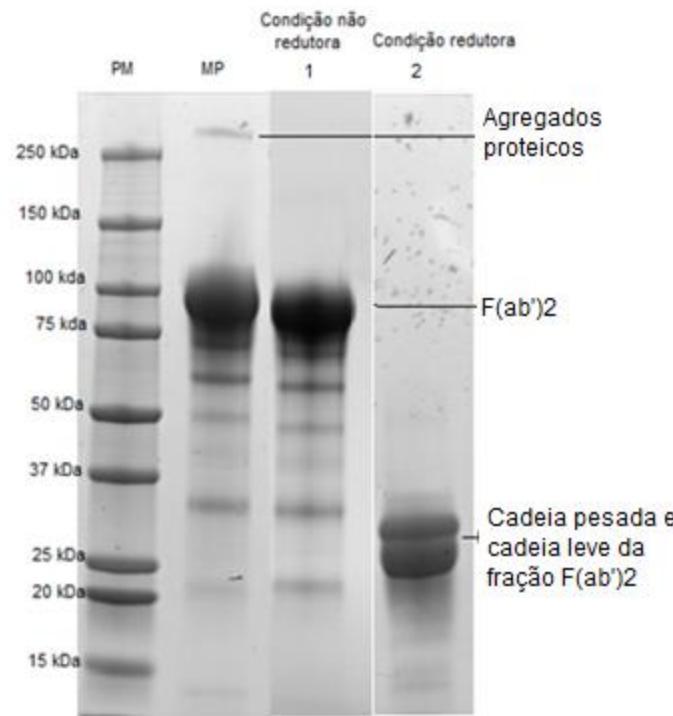


Figura 12: SDS-PAGE de antiveneno con proceso optimizado con pulido cromatográfico en la condición no reductora y en la condición reductora

COMPOSIÇÃO PROTEICA – SORO ANTIBOTRÓPICO C

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

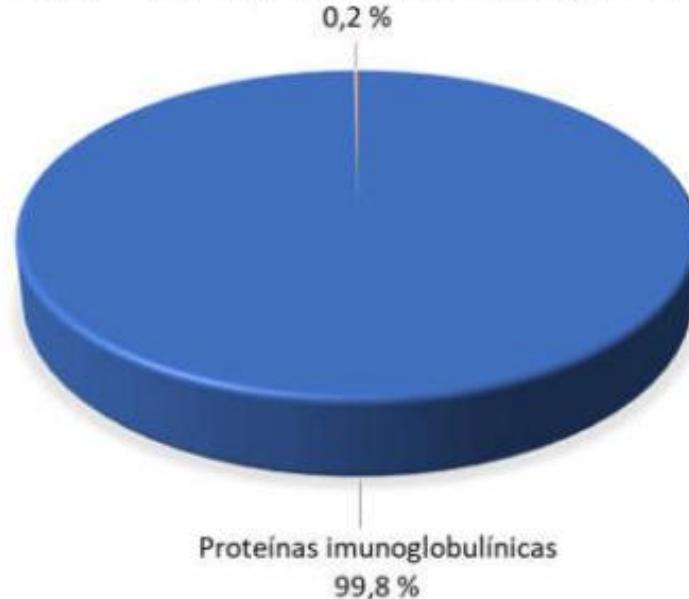


Figura 13: Análisis de espectrometría de masas con enfoque *shotgun*

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!

