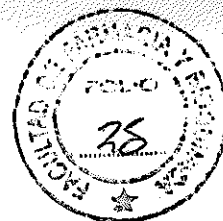




UBA
Universidad de Buenos Aires
Argentina virtus robur et studium



REFORMA
UNIVERSITARIA
1918-2018



EXP-UBA: 87868/2018

BUENOS AIRES; 11 de Diciembre de 2018.-

VISTO las presentes actuaciones referidas al Convenio Específico a suscribir entre la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" – ANLIS; y

CONSIDERANDO:

Que el presente convenio tiene por objeto el desarrollo de protocolos innovativos para la producción de sueros antiofídicos y su ensayo a escala piloto.

Que asimismo se consignan en el Anexo I de la presente el plan de trabajo junto con el cronograma de pagos.

Por ello y atento a lo aconsejado por la COMISIÓN DE CIENCIA Y TÉCNICA, y lo establecido en las Resoluciones (CS) N° 1655/87 y 5909/2009.

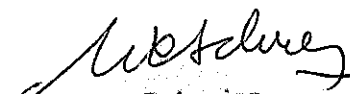
EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
Resuelve:

ARTÍCULO 1°: SOLICITAR al Consejo Superior de la Universidad de Buenos Aires la ratificación del Convenio Específico y el Anexo I a suscribir entre la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" – ANLIS, cuyo texto pasa a formar parte de la presente resolución.-

ARTÍCULO 2°.- Regístrese; dése a las Secretarías de Asuntos Jurídicos, Supervisión Administrativa y Ciencia y Técnica para las intervenciones de su competencia; cumplido elévese a la Universidad de Buenos Aires para su aprobación, previo envío de copia del Convenio firmado a la Dirección de Consejo Directivo por parte de la Secretaría de Asuntos Jurídicos; y oportunamente archívese.-

RESOLUCIÓN N° 512




Laura Schreier
Secretaria Académica


Cristina Arranz
Decana



UBA
Universidad de Buenos Aires
Argentina virtus robur et studium



REFORMA
UNIVERSITARIA
1918-2018



CONVENIO ESPECÍFICO

Entre la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, en adelante la FACULTAD, representada en este acto por su Decana, Prof. Cristina Arranz, con domicilio en la calle Junín 956 de esta Ciudad Autónoma de Buenos Aires, por una parte y por la otra la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" - ANLIS, representada en este acto por su Interventora Dra. Claudia Perandones, con domicilio en la calle Vélez Sársfield 563 de esta Ciudad Autónoma de Buenos Aires, en adelante EL ORGANISMO, acuerdan celebrar el presente Convenio Específico, enmarcado en el Convenio Marco suscripto entre las partes y aprobado por Consejo Directivo con fecha 11 de diciembre mediante Res. (CD) N° 511/18, sujeto a las siguientes cláusulas a saber:

PRIMERA: OBJETO: El presente convenio tiene por objeto el **DESARROLLO DE PROTOCOLOS INNOVATIVOS PARA LA PRODUCCIÓN DE SUEROS ANTIOFÍDICOS Y SU ENSAYO A ESCALA PILOTO**

SEGUNDA: UNIDAD EJECUTORA: Se designa como Unidad Ejecutora de las tareas emergentes de este Convenio a la Cátedra de BIOTECNOLOGÍA del Departamento de MICROBIOLOGÍA, INMUNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGIA de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

TERCERA: REPRESENTANTES TECNICOS: El ORGANISMO designa al Dr. Matías Fingermann, quien tendrá a su cargo la relación con la Facultad en cuanto a aspectos técnicos del desarrollo del trabajo. Por su parte, la FACULTAD designa como representante técnico al Dr. Osvaldo Cascone, quien tendrá a su cargo la dirección científica y ejecución de las tareas del mismo. El representante técnico de la Facultad podrá ser removido por ésta, con justa causa.

CUARTA: OBLIGACIONES DE LAS PARTES:

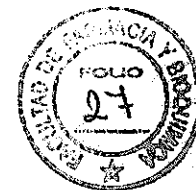
- 1) La FACULTAD se hará cargo del trabajo de diseño y supervisión de los trabajos correspondientes a la purificación de inmunoglobulinas antiveneno de caballo y de



UBA
Universidad de Buenos Aires
Argentina virtus robur et studium



REFORMA
UNIVERSITARIA
1918-2018



huevo tanto a escala de laboratorio como a escala piloto. Las tareas a desarrollar y los desembolsos parciales se describen en el Anexo de este Convenio.

2) El ORGANISMO abonará en concepto de aranceles, la suma de \$ 446.400 (pesos cuatrocientos cuarenta y seis mil cuatrocientos). Dichos pagos se efectivizarán periódicamente mediante depósito en la Tesorería de la Facultad para ser imputados conforme a la Resol. (CS) 1655/87 y 906/90. Ello, conforme al cronograma descrito en el ANEXO adjunto.

QUINTA: DISPONIBILIDAD PARCIAL: Se deja constancia que los docentes de la Facultad no emplearán en el cumplimiento de la tarea objeto de este convenio más del 30% del tiempo previsto para el régimen de dedicación exclusiva, de conformidad con la Resol. (CS) N° 1655/87 y 5909/09.

SEXTA: Los resultados parciales o definitivos, obtenidos a través de las tareas programadas podrán ser publicados de común acuerdo, dejándose constancia en las publicaciones de la participación correspondiente a cada una de LAS PARTES, debiéndose cumplir estrictamente con la Resolución (CS) N° 6157/16. Los derechos intelectuales que se originen en trabajos realizados en el marco del convenio pertenecen en su totalidad a la Universidad de Buenos Aires.

SÉPTIMA: el presente convenio no limita el derecho de las partes a la formación de acuerdos semejantes con otras Instituciones. Todo aquello no previsto en el convenio será resuelto de común acuerdo entre las partes.

OCTAVA: La suscripción del presente Convenio no implica otro vínculo entre las partes que los derechos y obligaciones comprendidos en el mismo y las partes mantendrán su individualidad y autonomía en sus respectivas estructuras técnicas, académicas y administrativas y asumirán particularmente las responsabilidades exclusivamente con relación a dicha parte.

NOVENA: Ambas partes deberán declarar el conocimiento de la Resolución (CS) N° 3404/99, en referencia a las pautas de utilización del logotipo, isotipo y nombre de la UBA.



UBA
Universidad de Buenos Aires
Argentina virtus robur et studium



REFORMA
UNIVERSITARIA
1918-2018



DÉCIMA: Vigencia: El presente convenio tendrá vigencia por un plazo de un (1) año a contar desde la fecha de la firma del mismo. Para su prórroga, las partes deberán fundar su voluntad de forma fehaciente con una anticipación de por lo menos TREINTA (30) días con relación a la fecha de vencimiento. No obstante ello, cualquiera de las partes podrá denunciar unilateralmente sin expresión de causa su voluntad contraria a la continuación de este Convenio, mediante preaviso escrito a la otra parte efectuado con una anticipación de TREINTA (30) días. La denuncia no dará derecho a las partes a reclamar indemnización y/o compensación de cualquier naturaleza. Los trabajos en ejecución al producir efecto la denuncia serán finalizados dentro del período anual en que la misma fuera formulada o dentro de los límites permitidos por el aporte financiero realizado.

DÉCIMA PRIMERA: Las partes se comprometen a no revelar a terceros ninguna información técnica originada en la otra parte, anterior o subsiguiente a la firma del presente, o que resulte de las tareas que constituyen el objeto de este Convenio. Asimismo, las partes se obligan a comprometer al personal que tuviere acceso a tal información a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial. Las partes se pondrán de acuerdo, por escrito, acerca de qué aspectos de la información desarrollada podrá divulgarse o publicarse y en qué forma.

DÉCIMA SEGUNDA: A los efectos del presente Convenio las partes se someten a la competencia de los Tribunales Federales de la Capital Federal, renunciando a cualquier otro fuero que pudiera corresponder. A tales efectos, el ORGANISMO constituye domicilio en la calle Vélez Sársfield 563, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la FACULTAD, en la calle Viamonte 430 P.B., de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Dirección de Mesa de Entradas, Salidas y Archivos del Rectorado y Consejo Superior, donde serán válidas las notificaciones judiciales. Asimismo, la FACULTAD constituye domicilio en la calle Junín 956, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, para las comunicaciones y notificaciones no judiciales vinculadas con el desarrollo y aplicación del Convenio.

En prueba de conformidad, se suscriben dos ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, quedando establecido que las obligaciones que asume la FACULTAD quedan sujetas a ratificación del Consejo Directivo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y del Consejo

gut



UBA
Universidad de Buenos Aires
Argentina: virtus robor et studium



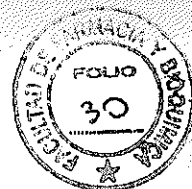
REFORMA
UNIVERSITARIA
1918-2018



Superior de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires a los 28 días del mes de diciembre de 2018.-

CRISTINA ARRANZ
DECANA
FFyB - UBA

Dra. CLAUDIA PERANDONES
Interventora
Administración Nacional de
Laboratorios e Institutos de Salud
ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran"



ANEXO

DESARROLLO DE PROTOCOLOS INNOVATIVOS PARA LA PRODUCCIÓN DE SUEROS ANTIPONZOÑOSOS Y SU ENSAYO A ESCALA PILOTO

El presente convenio tiene por finalidad proponer protocolos para la purificación de inmunoglobulinas de dos orígenes distintos para ser utilizadas como insumos en la elaboración de sueros antiponzoñosos.

Los protocolos propuestos serán puestos en práctica en el INPB-ANLIS-Malbrán bajo la supervisión del Dr. Osvaldo Cascone. Una vez ensayados a escala de laboratorio, se procederá al escalado hasta llegar a la escala piloto.

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

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

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

OBJETIVOS GENERALES

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

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



RELEVANCIA DEL PROBLEMA

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

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

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

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



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

RESULTADOS PRELIMINARES

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

JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO

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

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

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

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

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

Get



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

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

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

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

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

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

Una vez obtenido el sobrenadante conteniendo la IgG purificada, se procederá a la digestión con pepsina para obtener el fragmento (Fab')₂. Boushaba y col. (2003) reportaron que la cinética de digestión con pepsina es más rápida con (Fab')₂ que con plasma total, de manera que las condiciones a seleccionar serán diferentes, obligando a un diseño factorial

para la optimización del clivaje enzimático en condiciones más suaves. Se estudiarán los efectos del pH, relación enzima:sustrato, temperatura y tiempo de incubación sobre el porcentaje de ruptura enzimática y la presencia de agregados proteicos en un ensayo factorial 2^4 . Cada variable se trabajará en 2 niveles.

Una vez elegidos los parámetros optimizados se procederá a la diafiltración/ultrafiltración del sobrenadante con membrana de 30-50 kDa para cambiar el solvente a PBS y llevar la concentración de $(Fab')_2$ al valor adecuado para la formulación del antiveneno, se agregará fenol como conservador y se procederá a la filtración esterilizante final.

CRONOGRAMA DE TAREAS

TAREA	TRIMESTRES			
	1	2	3	4
Precipitación de las moléculas no-IgG con ácido caprílico				
Diseño factorial (2^4) según Nudel y col. (2012)	X			
Determinación de la velocidad de filtración	X			
Determinación de la turbidez del filtrado	X			
Determinación del rendimiento de IgG activa	X			
Determinación de la presencia de agregados		X		
Digestión con pepsina de la IgG purificada contenida en el sobrenadante del paso anterior				
Primer diseño factorial (2^4 , orientación)		X		
Determinación del porcentaje de ruptura enzimática		X		
Determinación de la presencia de agregados		X		
Determinación del rendimiento de fragmento $(Fab')_2$ activo		X		
Segundo diseño factorial (2^3 , definitivo)			X	
Determinación del rendimiento de fragmento $(Fab')_2$ activo			X	
Determinación de la presencia de agregados			X	
Formulación final				
Ultrafiltración, diafiltración y agregado de conservador				X
Filtración esterilizante				X
Envasado				X

Gd



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

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

La inmunización de gallinas será realizada en el INTA Castelar por personal especializado en esas tareas.

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

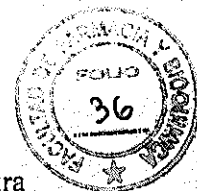
Debido a que la administración de sueros antiveneno es parenteral, el grado de pureza para los sueros de fuentes distintas del plasma de caballos inmunizados debe ser alto. Por lo tanto, la purificación es el paso crítico en su proceso de producción, lo que lleva a los productores a reconsiderar sus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

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

La cromatografía de afinidad (AC) se basa en un reconocimiento molecular entre la proteína de interés y un ligando inmovilizado sobre un soporte. Ésta permite disminuir el número de pasos y maximizar la pureza y el rendimiento del proceso por lo que es considerado el método más eficiente para el aislamiento y purificación de proteínas en mezclas complejas (Roque y Lowe, 2007). Si bien los anticuerpos monoclonales (mAbs) son ligandos cromatográficos de alta afinidad y especificidad, su elevado costo dificulta su uso a nivel industrial. Por otro lado, los péptidos cortos son ideales como ligandos para separaciones industriales por afinidad ya que pueden ser sintetizados a un costo muy inferior a los mAbs y en forma aséptica bajo normas GMP. Son mucho más estables porque no requieren de una estructura terciaria específica para mantener su actividad biológica y son fáciles de inmovilizar en las matrices cromatográficas con alto rendimiento. Las matrices con péptidos cortos inmovilizados tienen una larga vida útil ya que la unión del péptido al soporte cromatográfico es muy estable. Las interacciones entre los péptidos y las proteínas son generalmente moderadas, lo que resulta en condiciones suaves de elución (Huang y Carbonell, 1995).

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

Aut



CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON LIGANDOS PEPTÍDICOS

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

CRONOGRAMA DE TRABAJO

TAREA	TRIMESTRES			
	1	2	3	4
Obtención del extracto acuoso	X			
Caracterización proteómica del extracto acuoso	X			
Confección de la biblioteca peptídica		X	X	
<i>Screening</i> de la biblioteca peptídica			X	
Identificación de los péptidos candidatos			X	
Unión de los péptidos candidatos a un soporte cromatográfico				X
Ensayo de la matriz de afinidad				X

GA

CRONOGRAMA DE PAGOS

Doce (12) pagos mensuales de \$ 37.200.



BIBLIOGRAFÍA

Ávila, L., De Marco, M.B., Fingerhann, M., Temprano, G., Iácono, R., Dokmetjian, J.C. y Cascone, O. (2013) Antivenenos ofídicos: comparación del desempeño de dos métodos de obtención. *Rev. Arg. Salud Pública* 4, 12-17.

Boushaba, R., Kumpalume, P., Slater, N.K. (2003) Kinetics of whole serum and prepurified IgG digestion by pepsin for F(ab')₂ manufacture. *Biotechnol. Prog.* 19, 1176-1182.

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.

Chippaux, J.P. (1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull. WHO* 75, 515-524.

Dias, W.O., Esteves, M.I., Furuta, J.A., Higashi, H.G., Marcellino, J.R., Oishi, N.Y., Prado, S.M.A., Tanaka, A.M., Ueda, C.M.P.M., Raw, I. (1989) Chromatographic purification of antivenoms and antitoxins. *Mem. Inst. Butantan* 51, 195-203.

Furka, A., Sebestyen, F., Asgedom, M., Dibo, G. (1991) General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 37, 487-493.

Huang, P.Y., Carbonell, R.G. (1995) Affinity purification of proteins using ligands derived from peptides libraries. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 288-297.

Jones, R.G.A., Landon J. (2002) Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody (Fab')₂ in high yield from serum. *J. Immunol. Methods* 263, 57-74.

Ladisch, M.R. (2001) En: *Bioseparation Engineering: Principles, Practice, and Economics*. John Wiley & Sons, New York, 36-48.

Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmierski, W.M. (1991) A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 354, 82-84.

McKinney, M.M., Parkinson, A. (1987) A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluids. *J. Immunol. Methods* 96, 271-278.



Morais, V., Massaldi, H. (2005) Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon*46, 876-882.

Morais, V.M., Massaldi, H. (2009) Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 15, 2-18.

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., Cascone, O. (2012) Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon*59, 68-73.

Otero, R., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Núñez, V., Díaz, A., Miranda, E., Uribe, A.F., Silva, J.F., Ospina, J.G., Medina, Y., Toro, M.F., García, M.E., León, G., García, M., Lizano, S., De La Torre, J., Márquez, J., Mena, Y., González, N., Arenas, L.C., Puzón, A., Blanco, N., Sierra, A., Espinal, M.E., Arboleda, M., Jiménez, J.C., Ramírez, P., Díaz, M., Guzmán, M.C., Barros, J., Henao, S., Ramírez, A., Macea, U., Lozano, R. (1999) A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon*37, 895-908.

Perosa, F., Carbone, R., Ferrone, S., 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.

Roque, A.C.A., Lowe, C.R. (2007) En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 421: Affinity Chromatography: Methods and Protocols, Zachariou M Ed., Springer, USA.

Smith, D.C., Reddi, K.R., Laing, G., Theakston, R.G.D., Landon, J. (1992) An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Viperaberus* envenoming. *Toxicon*30, 865-871.

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

Wang, J., Diehl, T., Aguilar, D., Dai, X.P., Arunakumari, A. (2009) *International BioPharm supplement*, October 2.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "J. A." or similar, located at the bottom left of the page.