

CONVENIO DE VINCULACIÓN

En la ciudad de Montevideo, a los veintinueve días del mes de febrero de dos mil veintidós, comparecen: I) **Por una parte: BENTEN BIOTECH SOCIEDAD DE RESPONSABILIDAD LIMITADA**, representada en este acto por Jorge Wenzel Wenzel, C.I. 3.551.437-1, con domicilio en Av. Italia 6201, LATU - Edificio Los Robles (en adelante la "Empresa"), II) **Por la otra parte: UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE QUÍMICA**, representada por su Rector, Rodrigo Arim Ihlenfeld, con domicilio en Av. 18 de julio 1824 de esta ciudad (en adelante la "Entidad", y la Empresa juntamente con la Entidad, de considerarán las "Partes"), acuerdan constituir y otorgar el presente acuerdo de vinculación (en adelante, el "Contrato de Vinculación").

PRIMERO. Antecedentes.

1.1 La Empresa gestionó ante la ANII, en el marco del Programa Articulación Academia – Sector Productivo, financiamiento mediante la modalidad de Subsidio, para el proyecto Número ART_X_2021_1_170466 denominado "Desarrollo de estándares recombinantes sustitutos de sueros neutralizantes de toxinas clostridiales y kits de cuantificación in-vitro de las mismas, para uso en la industria de producción de vacunas veterinarias" (en adelante el "Proyecto"). En la propuesta presentada ante la ANII, la Empresa asumió la obligación de formalizar un convenio de vinculación con la Entidad, en caso de que el Proyecto resulte aprobado por la ANII, a los efectos de establecer un vínculo jurídico entre las partes para la ejecución del mencionado Proyecto.

1.2 Recientemente, se recibió notificación por parte de la ANII, comunicando que se entiende pertinente recomendar la formulación del Proyecto en el marco de la convocatoria.

SEGUNDO. Objeto.

A los efectos de la ejecución del Proyecto, y siendo una condición esencial para conceder el financiamiento que otorgará la ANII, la Empresa y la Entidad suscriben el presente acuerdo con el objeto de regular las relaciones internas de las mismas, así como su vinculación frente a la ANII y frente a terceros.

TERCERO. Plazo.

El plazo de duración del presente Convenio de Vinculación será de 36 meses.

CUARTO. Domicilios.

El domicilio de la Empresa y de la Entidad a los efectos del presente Convenio de Vinculación es el que surge de la comparecencia.

QUINTO. Responsabilidad.

Respecto de cualquier tipo de obligación que pueda surgir en la ejecución del Proyecto, las partes comparecientes responderán entre ellas únicamente por las obligaciones que son puestas a su cargo y que asumen para la ejecución del Proyecto, reputándose dichas obligaciones divisibles.

SEXTO. Admisión de nuevos integrantes y/o cesión de participaciones.

No se admitirán nuevos integrantes ni la cesión total o parcial de la participación que la Empresa o la Entidad asume por el presente Convenio de Vinculación, sin el previo consentimiento de las Partes

SÉPTIMO. Vinculación con la ANII.

Las Partes declaran conocer y aceptar que el vínculo establecido por el presente Convenio de Vinculación regula exclusivamente las relaciones jurídicas entre las Partes comparecientes, y que no existe en virtud del presente vínculo o relación alguna entre ellas y la ANII, sin perjuicio del vínculo que mantiene la Empresa y la ANII conforme a la documentación suscrita en virtud de la ejecución Proyecto. En este sentido y sin perjuicio de lo anterior, la Entidad, declara conocer y aceptar que, la Empresa, en su calidad de adjudicataria de la financiación otorgada por la ANII a los efectos de la ejecución del Proyecto, tiene plenas facultades para acordar con la ANII los términos y condiciones que ambas partes estimen convenientes, declarando, asimismo, que se obligan a ceñirse a los términos y condiciones pactadas o que pacte en el futuro la Empresa y la ANII para la ejecución del Proyecto, en lo que respecta a las obligaciones asumidas por cada parte de acuerdo a lo establecido en el Proyecto y en la cláusula Noveno del presente Convenio de Vinculación, y su responsabilidad frente a la ANII. A tales efectos, la Empresa se obliga a comunicar inmediatamente a la Entidad cualquier modificación que se produjera en los términos y condiciones del Proyecto y el financiamiento.

OCTAVO. Administración.

La dirección del Proyecto estará a cargo de una Gerencia, que será ejercida por una Comisión integrada por un representante de cada una de las Partes que será debidamente comunicada una vez firmado el presente Convenio.

La Gerencia realizará las tareas de administración y dirección y tendrá los siguientes cometidos:

- a) Coordinar las actividades para el mejor cumplimiento del Proyecto y las actividades relacionadas con el mismo, derivados de la adjudicación;
- b) Asegurar la unidad de criterios;
- c) Dirimir los conflictos internos que pudieran surgir en la ejecución de las tareas y actividades propias del Proyecto y cumplir con el cronograma de ejecución de este, teniendo en todo caso como objetivo prioritario el más exacto cumplimiento del Proyecto y del contrato ha celebrarse con la ANII.
- d) Designar a BENTEN BIOTECH SRL como Entidad Responsable ante la ANII.

Respecto a la deliberación de la Gerencia, le corresponderá a cada integrante 1 voto. A los efectos de su convocatoria, uno cualquiera de los integrantes deberá citar por escrito o vía correo electrónico a los restantes, indicando las materias específicas sobre las que habrán de pronunciarse. Todas las resoluciones se adoptarán por mayoría simple de votos, no de presentes.

La participación y las votaciones podrán ser realizadas en forma personal o a distancia, esto es, por carta simple enviada por fax, escaneada en un archivo adjunto en correo electrónico, o bien vía correo ordinario.

NOVENO. Participación en los trabajos.

De conformidad con lo que se establece en la cláusula Quinto, cada una de las Partes realizará las actividades y tareas que se establecen en el Plan de Trabajo del Proyecto que se adjunta como Anexo I del presente Convenio de Vinculación, y de conformidad a las pautas que allí se indican.

Las partes convienen en que, la Empresa abonará a la Entidad, de lo que perciba de la ANII por concepto de apoyo económico para la ejecución del Proyecto, la suma que se indica a continuación, correspondiente a la cuota parte de ejecución del Proyecto.:

- I) ENTIDAD le corresponde la suma de \$UY 4.955.775,00 (pesos uruguayos cuatro millones novecientos cincuenta y cinco mil setecientos setenta y cinco 00/100).

Sin perjuicio de ello, y sin que implique modificación de la distribución de tareas, servicios y suministros definidos en este Convenio de Vinculación, las partes podrán en cualquier momento renegociar entre sí los ajustes y modificaciones que entiendan pertinentes, siempre que la Empresa haya obtenido la previa aprobación de la ANII, y siempre y cuando no se afecte la continuidad de las actividades de ejecución del Proyecto ni la calidad de las prestaciones.

Se deja expresa constancia que la distribución de tareas establecida en la presente cláusula queda subordinada a la obligación prioritaria de dar cumplimiento al Proyecto.

DÉCIMO. Relaciones internas entre la Entidad. Cumplimiento del Proyecto.

Queda expresamente acordado que las partes e ajustarán en su actividad relacionada con el Proyecto a que refiere el presente Convenio de Vinculación, en forma estricta y en un todo de conformidad a sus disposiciones, a los requerimientos del pliego del llamado y al contenido de la propuesta presentada a la ANII por la Empresa a la que darán cumplimiento con la máxima diligencia, profesionalidad y lealtad, procurando llevar a cabo las prestaciones, tareas y servicios en los plazos estipulados y con la más alta calidad.

DÉCIMO PRIMERO. Confidencialidad.

Cada una de las Partes, se comprometen a no difundir, bajo ningún concepto, las informaciones científicas o técnicas pertenecientes a cualquiera de las otras Partes a las que haya podido tener acceso en virtud de la ejecución del Proyecto. Asimismo, las partes acuerdan que los datos e informaciones relativas al Proyecto, tienen el carácter de confidencial. A tales efectos las partes garantizan dicha confidencialidad respecto del personal que trabaje en la ejecución del Proyecto. En todo caso, la publicación de los datos acerca del Proyecto se realizará de común acuerdo entre las Partes.

DÉCIMO SEGUNDO. Propiedad sobre las innovaciones.¹

Los derechos de propiedad intelectual respecto de los resultados obtenidos, así como de los procesos utilizados por las Partes en relación con el Proyecto, serán explotados conjuntamente por las Partes, las cuales podrán, asimismo, difundir los resultados obtenidos de la manera que entiendan conveniente de común acuerdo. Las partes podrán solicitar conjuntamente el registro o protección sobre su propiedad intelectual tanto en el país como fuera del mismo, asumiendo los costos en la proporción que en cada caso corresponda según la participación de cada Entidad en el Proyecto o en su defecto, según lo acordado por las partes.

DÉCIMO TERCERO. Rescisión.

Este presente contrato se resolverá de pleno derecho y sin responsabilidad, en caso de que, por razones ajenas a la voluntad de las partes, éstas no puedan cumplir con el objeto de este.

Asimismo, las partes acuerdan que el incumplimiento de alguna de las partes de las obligaciones respectivamente asumidas dará derecho a la otra parte a solicitar la rescisión de este contrato más los daños y perjuicios si correspondieren.

DÉCIMO CUARTO. Legislación y jurisdicción.

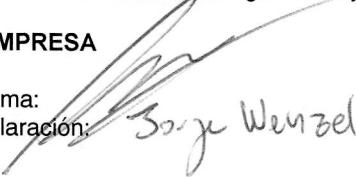
Las partes acuerdan que la legislación aplicable al presente será la de la República Oriental del Uruguay y que los jueces competentes para la interpretación y ejecución de las disposiciones del presente Convenio de Vinculación serán los jueces de Montevideo. Asimismo, establecen que toda notificación que deban practicarse se verificará mediante telegrama colacionado o cualquier otro medio de comunicación fehaciente, dirigido a los domicilios constituidos en este Convenio de Vinculación.

Y para constancia se otorgan tres ejemplares de un mismo tenor en los lugares y fechas indicados en la comparecencia.

EMPRESA

Firma:

Aclaración:


Jorge Wenzel

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE QUÍMICA

Firma:

Aclaración:



Prof. Rodrigo Arim Ihlenfeld
Rector

Web: www.bentenbiotech.com

Generador de Conocimiento/Tecnología: Universidad de la República / Centro
Universitario Regional Este / Laboratorio de Ecología Molecular

Sector: Sector Educación Superior/Público

Departamento: Rocha

País: Uruguay

Ciudad: Rocha

Dirección: 9, 27000 Rocha, Departamento de Rocha

Teléfono: 44727001

Email: andresgontech@gmail.com

Web: <http://www.cure.edu.uy>

RRHH

Co-responsable del Proyecto: Esteban Guerra

Documento: Cédula de Identidad 34971211

Organización: Benten Biotech

RUT: 170313640014

Razón social: Benten Biotech SRL

Sector Organización: Sector Empresas/Privado

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 10

Meses de participación en el proyecto: 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Responsable científico por parte de la empresa

Co-responsable del Proyecto: Andrés GONZÁLEZ TECHERA

Documento: Cédula de Identidad 18843090

Organización: Universidad de la República / Centro Universitario Regional Este / Laboratorio de Ecología Molecular

Sector Organización: Sector Educación Superior/Público

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 20 **Meses de participación en el proyecto:** 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Responsable científico del proyecto por parte de la Academia

Investigador: María Cecilia ALONSO URQUIOLA

Documento: Cédula de Identidad 35885156

Organización: Universidad de la República / Centro Universitario Regional Este / Laboratorio de Ecología Molecular

Sector Organización: Sector Educación Superior/Público

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 5 **Meses de participación en el proyecto:** 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Investigador al proyecto

Investigador: Triana DELFIN RIELA

Documento: Cédula de Identidad 40637374

Organización: Benten Biotech

RUT: 170313640014

Razón social: Benten Biotech SRL

Sector Organización: Sector Empresas/Privado

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 5 **Meses de participación en el proyecto:** 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Investigador al proyecto en la empresa

Investigador: Lucía RODRIGUEZ CALLERIZA

Documento: Cédula de Identidad 46625426

Organización: Benten Biotech

RUT: 170313640014

Razón social: Benten Biotech SRL

Sector Organización: Sector Empresas/Privado

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 20 **Meses de participación en el proyecto:** 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Investigador al proyecto Empresa

Responsable por la ejecución: Jorge WENZEL WENZEL

Documento: Cédula de Identidad 35514371

Teléfono: 098969939

Email: jorgewenzel@bentenbiotech.com

Organización: Benten Biotech

RUT: 170313640014

Razón social: Benten Biotech SRL

Sector Organización: Sector Empresas/Privado

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 5 **Meses de participación en el proyecto:** 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: gestión del proyecto

Responsable económico y financiero: Esteban Guerra

Documento: Cédula de Identidad 34971211

Organización: Benten Biotech

RUT: 170313640014

Razón social: Benten Biotech SRL

Sector Organización: Sector Empresas/Privado

País Organización: Uruguay

Dedicación al proyecto (horas semanales): 5

Meses de participación en el proyecto: 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Sera responsable de la aprobación y ejecución de los pagos asociados al proyecto.

Investigador a contratar

Perfil: Bioquímico, bioquímico clínico, biologo o afines

Dedicación al proyecto (horas semanales): 40

Meses de participación en el proyecto: 36

Descripción de las tareas a desarrollar en el proyecto: Realizará su doctorado en el marco del proyecto

ESPECIFICACIÓN DEL PROYECTO

ESPECIFICACIÓN DE LA ALIANZA

Descripción del Problema y Pertinencia de la Asociación:

Desde 2016, desde Benten preveíamos que el problema del control de potencia de vacunas veterinarias por falta de estándares para control de calidad y por la sustitución de modelos animales, estos desafíos se han profundizado al día de hoy. En 2017 diseñamos un proyecto de dos años para la purificación y estandarización de todas las toxinas y antitoxinas clostridiales frente a los reactivos de referencia de USDA APHIS y OMS. Para la ejecución de este proyecto se solicitó a la ANII la financiación de un recurso humano para ejecutar el mismo (proyecto HPI). Este proyecto culminó exitosamente logrando todos los productos, que continúan comercializándose a laboratorios en 3 continentes y la profesional continua en el staff de la empresa. Dicho proyecto permitió montar un banco de materiales biológicos, base que posibilita el desarrollo de nuevas tecnologías para el control de potencia y antígenos de vacunas clostridiales in vitro.

Dentro de la estrategia de desarrollo de la empresa, en 2018 definimos un conjunto de acciones que nos permitieran

pasar de ser una CRO, proveedora de servicios de I+D+i, a ser una CMO, empresa que se especializa en desarrollar y producir. En este sentido, estamos avanzado hacia productos de nicho, de alto valor agregado intensivos en conocimiento que luego serán producidos por Benten.

La primera acción, fue consolidarse como CRO disponiendo de un laboratorio de I+D+i propio, diseñado y equipado para ese fin, donde están operativas las plataformas (infraestructuras, equipamientos, recursos humanos y know-how) con las cuales Benten desarrolla su negocio y avanza a una nueva etapa. Esta acción comenzó con la construcción de un laboratorio de 120m2 en el Parque LATU, financiado con créditos solicitados por los socios de Benten mediante 2 créditos en el BROU y el Crédito Italiano (ANDE) sumada a una extensión de la garantía del estado SIGA para Pymes para facilitar el acceso. La ejecución de la obra fue llevada adelante en plena pandemia (octubre a diciembre de 2020).

Luego se consolidaron y montaron las plataformas de bacteriología, virología, inmunología, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales recombinantes y purificación de proteínas. Para financiar el montaje de estas plataformas Benten logró una importante inversión en proyectos de I+D en modalidad CRO de empresas privadas locales (Konig, Biomega, Microsules y La Constancia) , como del exterior (Vecol de Colombia, Pasteur de Rumania y Dollvet de Turquía). Estos proyectos dieron flujo de capital a la empresa que permitió financiar las plataformas de forma parcial.

Asimismo, empresas proveedoras locales facilitaron créditos para la compra de equipos y reactivos (Teksol, Tagaca, Biokey y Cavinsur SA). También se obtuvo apoyo para la adquisición de equipos y contratación de profesionales a través de herramientas HPI e IDI de la ANII. Por último, La DNI-MIEM ha aportado fondos para la adquisición de equipamiento pesado de alto valor a través del fondo biotecnológico. Sumado a lo anterior, se ha logrado conformar un equipo de profesionales de alto nivel integrado principalmente por doctoras y magíster en ciencias bilógicas.

Esta situación nos impulsa a avanzar hacia la etapa de construcción de una CMO, empezaremos a ejecutar los proyectos propios que nos permitirán desarrollar la empresa en dicho modelo, y concretar la tracción comercial que permita un crecimiento exponencial.

Los primeros proyectos en esta línea son:

- a) Producción de anticuerpos recombinantes a proteína NS1 ZIKA (Con solicitud de financiamiento ANII-HPI en proceso de evaluación)
- b) Producción de anticuerpos recombinantes a flagelina de C chauvoei (con financiamiento ANII HPI en ejecución)
- c) Desarrollo de estándares recombinantes sustitutos de sueros neutralizantes de toxinas clostridiales y kits de cuantificación in-vitro de las mismas, para uso en la industria de producción de vacunas veterinarias

La inversión para la aceleración para avanzar al modelo CMO son muy superiores a la disponibilidad de capital de giro o reinversión de Benten. También escapa a los montos y riesgo tradicional de los fondos de inversión que actúan en

Uruguay. Al mismo tiempo, toda la capacidad de crédito que la empresa tiene fue invertida en la obra de infraestructura, dejando un margen pequeño para contingencias en el flujo de capital. Es por esto, que seguimos solicitando el apoyo de la ANII para llevar adelante los proyectos que permitirán un incremento en la facturación e independizarnos de fuentes de promoción del desarrollo.

En este marco, y sumando la complejidad técnica de los proyectos en biotecnología, Benten se encuentra obligada a expandir sus capacidades de forma externa. Con este objetivo último, es que se plantea una Alianza con el laboratorio del Dr. Andrés Gonzalez en el CURE-UDELAR. Esta alianza, permitirá a Benten en conjunto con la ANII desarrollar las capacidades del grupo de investigación en cuanto a equipamientos, reactivos y la formación de recursos humanos en el área. Esto promocionará la generación de conocimiento estratégico para el posterior desarrollo de tecnologías para la industria. Este círculo virtuoso se cierra con el financiamiento de más proyectos para la generación de know-how estratégico por la academia.

La consolidación del grupo del Dr. Gonzalez a través de esta alianza, aumentará sus capacidades para la generación de conocimiento y para la formación de recursos humanos, ambos cometidos de la función docente de la UDELAR de acuerdo a la ley orgánica.

Es estratégico para nuestro negocio lograr ser la primera empresa en el mundo en disponer de los anticuerpos neutralizantes en forma recombinantes y procurar que estos sean reconocidos por el NIBSC de la OMS como los nuevos estándares Internacionales. Confiamos que el Dr. González y su equipo tienen mucho para aportar para facilitar ese camino.

Los cometidos comerciales de esta alianza se basan en que hemos constatado, como se mencionó al inicio, un incremento de la demanda de las empresas productoras de vacunas veterinarias por el desarrollo e interés del mercado por:

- A) Estándares para la cuantificación de toxinas y test de potencia
- B) Sistemas de cuantificación de antígenos protectores in vitro y en tiempo real

La experiencia del Dr. Gonzalez en conjunto con el equipo de Benten permitirán avanzar rápidamente en esos objetivos.

Antecedentes del Equipo de Trabajo:

Antecedentes del Grupo de trabajo por parte de la Academia. El Dr. Andrés González es el Responsable Científico del proyecto. Es Profesor Grado 3 de la UDELAR, en Régimen de Dedicación Total, y miembro del sistema nacional de investigadores, ha trabajado desde el 2009 hasta el 2020 en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química

vacunadas como parte de su cuidado sanitario). Luego de administrar la vacuna se esperará un mes y se administrará un booster dejando otro mes para maximizar las cantidades de linfocitos circulantes con genes codificantes para anticuerpos o BCRs específicos para las toxinas. Posteriormente se extraerá sangre, se aislarán células mononucleares y se realizará una extracción de ARN total. De este ARN total y mediante técnicas de Biología Molecular se construirá una biblioteca de nanobodies en fagos filamentosos. En paralelo se expresarán las toxinas recombinantes, o fragmentos de las mismas (biotiniladas in vivo), en E.coli y serán purificadas por IMAC. Éstas serán necesarias para el proceso de selección o panning de nanobodies específicos para las mismas.

SELECCIÓN DE CLONES PRODUCTORES DE NANOBODIES ESPECÍFICOS PARA LAS TOXINAS A PARTIR DE LAS BIBLIOTECAS.

Una vez que se cuente con la biblioteca y las toxinas purificadas, se realizarán rondas de selección inmovilizando las toxinas en pocillos de placas de ELISA y posterior incubación con la biblioteca de nanobodies en Fagos. Los fagos eluidos serán amplificados para realizar otra ronda de selección, tras lo cual se podrán testear clones independientes contra sus respectivas toxinas por ELISA. Lo esperable, basados en nuestra experiencia, es que en esta etapa al menos un 80% de los clones sean específicos para las toxinas. De no ser así se realizarán 1 o 2 rondas de selección adicionales. Las secuencias codificantes se transferirán "en masa" a un sistema de expresión robusto como el de la cepa de E.coli, BL21, utilizando el plásmido con promotor para la ARN polimerasa T7, pLEMB-HA (ver Figura 1 del ANEXO). En esta instancia se realizará un nuevo screening en ELISAs para confirmar la presencia de nanobodies específicos en el sistema de expresión robusto. Posteriormente se realizará un segundo screening de unos 10 clones positivos individuales. Las secuencias codificantes para nanobodies de estos clones serán secuenciadas. El nanobody a ser utilizado como agente de captura será seleccionado mediante ELISA con muy bajas cantidad de toxina inmovilizada en la placa, de forma de identificar aquellos clones que presenten las mayores señales (mayor expresión/afinidad).

SCREENING DE CLONES QUE RECONOZCAN EPÍTOPES NO SOLAPANTES EN FORMATO DE ALTO RENDIMIENTO. Se seleccionará 1 clon de alta expresión y afinidad para cada toxina. Sus respectivas secuencias serán clonadas en un vector que permite la biotinilación in vivo de nanobodies en E.coli, denominado pLEMB-biot (ver Figura 1 del ANEXO). Con estos nanobodies biotinilados y purificados se realizará un screening de alto rendimiento para la identificación de clones que reconozcan epítopes no solapantes.

DESARROLLO DE ELISAS Y TEST DE AGLUTINACIÓN DE LÁTEX PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS.

Los clones identificados en el punto anterior serán producidos para montar ELISAs de tipo sándwich para la generación de curvas estándar de las toxinas en buffer. Los ensayos más sensibles serán evaluados posteriormente en un lisado clostridial de una especie no relacionada con las especies productoras de las toxinas de interés (de *C botulinum* o *C tetanicum*) de modo de evaluar el efecto de la matriz. Esto será descrito en detalle en la sección metodología. Por otro lado, estos mismos clones serán clonados y producidos biotinilados desde el vector pLEMB-biot. Una vez purificados serán utilizados como mezclas para dar lugar a ensayos de aglutinación de látex, policlonales, lo cual favorecerá la formación de una malla generada por inmunocomplejos. En estos ensayos se utilizarán partículas de látex recubiertas con estreptavidina. Esto permitirá un monitoreo semicuantitativo, en tiempo real, de la producción de toxina en los fermentadores y permitirá evaluar rápidamente en qué momento la producción en la fábrica alcanzó una meseta y puede ser detenida.

DESARROLLO DE ESTÁNDARES RECOMBINANTES A SER UTILIZADOS EN ENSAYOS DE POTENCIA DE VACUNAS EN RATONES. En relación a la generación de los estándares recombinantes, como se mencionó anteriormente, es necesario que los anticuerpos sean neutralizantes de las toxinas. Para determinar esto se deberán realizar ensayos de desafíos en ratones para determinar cuáles nanobodies dan lugar a resistencia a la toxina.

Para esto, los nanobodies previamente purificados para realizar ensayos sandwich, serán mezclados con 2 dosis letales de las respectivas toxinas, incubados y administrados a grupos de ratones. Aquellos nanobodies que confieran protección serán neutralizantes. Para generar un reactivo más potente, que permita mantener su efecto protector a concentraciones menores los nanobodies neutralizantes serán fusionados a nivel genético con un nanobody específico para la Albúmina de ratón. Dado su pequeño tamaño, una vez inoculados en el ratón los nanobodies difunden y son rápidamente eliminados por los riñones, siendo excretados en la orina. Teniendo esto en cuenta se generarán nanobodies biespecíficos en el cual el primer nanobody será contra la toxina de interés y el segundo contra la albúmina de ratón. De esta forma el nanobody biespecífico se unirá a la albúmina y será retenido en circulación. Una vez identificados los nanobodies neutralizantes, se estudiará su expresión y afinidad de forma de generar el mejor estándar recombinante posible.

Metodología:

- 1) Inmunización de llamas y construcción de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos.

como docente e investigador. Recientemente se ha trasladado al Laboratorio de Ecología Molecular del CURE en Rocha, aunque su cargo continúa siendo de Facultad de Química, por el momento (es por esto que se presentan cartas aval de ambas instituciones). Cuenta con más de 18 años de experiencia en el desarrollo de inmunoensayos y una extensa formación en múltiples técnicas de Biología Molecular.

Dra Cecilia Alonso. Responsable del Laboratorio de Ecología Molecular del CURE, en Rocha. Es Profesora Grado 3 DT de la UDELAR desde el año 2011 y miembro del sistema nacional de investigadores. Realizó su doctorado en el Instituto Max Planck para la Microbiología Marina, en Alemania. Cuenta con una amplia experiencia en el uso de técnicas de biología molecular y microbiología y ha combinado técnicas de biología molecular y microscopía para el desarrollo de novedosas técnicas de visualización de comunidades de bacterias por diferentes tipos de microscopía.

Grupo de trabajo por parte de la Empresa. La empresa Benten Biotech SRL es una empresa de biotecnología cursando el quinto año de existencia. Los socios a cargo de la empresa son el Dr. Esteban Guerra y el Dr. Jorge Wenzel. El Dr. Guerra ha trabajado más de 15 años en el desarrollo y escalado industrial en la producción de biológicos veterinarios en diversos países. Por otro lado, el Dr. Wenzel acumula más de 10 años de experiencia en microbiología industrial. DMV Esteban Guerra, Director de la empresa Benten Biotech se ha desempeñado por más de 15 años como consultor de laboratorios de producción de vacunas en Argentina, Turquía, Brasil, Rumania, Colombia. Entre otras actividades tiene a su cargo el desarrollo de la línea de negocio de transferencia tecnológica y formulación de proyectos de I+D+i para laboratorios veterinarios.

Msc Lucía Rodrigues: Es la profesional responsable en Benten Biotech de la producción, purificación y estandarización de todas las toxinas clostridiales y sus correspondientes antitoxinas. Estos desarrollos han sido llevados adelante con el apoyo de diferentes herramientas ANII, los cuales han sido exportados y han permitido a su vez montar en Uruguay servicios de control de potencia de vacunas permitiendo evaluar en Uruguay muestras de vacunas que nuestros clientes nos envían desde el exterior (Rumania, Brasil, Colombia, Turquía, Argentina, Jordania etc) consolidando de esta forma nuestra posición de liderazgo en esta área.

Licenciada en Bioquímica Triana Delfin se encuentra por defender su tesis doctoral en Biotecnología, titulada "Uso de anticuerpos mono-dominio como herramienta en el diagnóstico clínico". Este trabajo de investigación se ha centrado en el desarrollo y producción de nanobodies, y a partir de ellos, desarrollar sistemas de cuantificación in vitro (ELISA, técnicas Inmuncromatográficas) contra diferentes antígenos de interés. Triana Delfin participará como apoyo en algunas actividades.

¿Existe regulación referente al proyecto?:

Los reactivos y kits incluidos en el presente proyecto no se encuentran bajo regulación, al tratarse de productos validados in house las autoridades sanitarias de los diferentes países toman como válida la información aportada por las empresas donde validan sus resultados. Bentech Biotech ha exportado a diferentes países en Europa , Asia y LATAM reactivos (Toxinas y Antitoxinas estandarizadas) con los permisos correspondientes para su exportación e importación los cuales son otorgados por las autoridades sanitarias correspondientes del país destino.

ESPECIFICACIÓN DEL PROYECTO

Análisis de la situación actual:

El control de potencia de las vacunas clostridiales a nivel internacional se basa en la normativa establecida por la farmacopea Europea o la Americana. Los gobiernos de los diferentes países han ido adoptando estas normativas con el objetivo de generar avances en la mejora del control y por ende de la calidad de los biológicos comercializados .

Por otro lado los reactivos necesarios para la realización de dichos test eran proporcionados por:

a) NISBC de la OMS, donde exclusivamente se provee de antitoxinas (policlonales) estándares internacionales, e incluso han discontinuado ya su estándar internacional para la toxina letal de *C. sordellii*. Hemos realizado gestiones sobre esta interrupción de suministro y no hay al día de hoy certeza de que este estándar esté disponible en el mercado en el futuro inmediato.

b) El USDA APHIS de los Estados Unidos, desde hace más de 3 años este organismo no provee más estándares a empresas fuera de los Estados Unidos. Anteriormente era una fuente de reactivos estandarizados y algunos sistemas de cuantificación in vitro. Las consultas realizadas con el Dr Paul Hauer (Director-Policy, Evaluation and Licensing) confirmaron que este escenario se mantendrá en el futuro.

c) MAPA LANAGRO es la autoridad responsable entre otros cometidos del control de los biológicos veterinarios de Brasil , también este centro era un proveedor de algunas toxinas y antitoxinas estandarizadas empleadas en los test de potencia. Desde hace ya algunos años a discontinuado el suministro para empresas del exterior e incluso las empresas de Brasil no siempre disponen de estos reactivos

Este desfase entre la normativa vigente cada vez más exigente y la no disponibilidad en el mercado de los reactivos necesario para su implementación, así como la calidad de los mismos abren una oportunidad que pretende capitalizar

el presente proyecto, generando por primera vez reactivos de secuencia de ADN codificante conocida.

Este proyecto está basado en el uso de fragmentos de anticuerpos de llama específicos para toxinas clostridiales de interés para la industria de las vacunas veterinarias. Históricamente los primeros anticuerpos producidos intencionalmente por el hombre estaban basados en mezclas de anticuerpos específicos para el antígeno de interés (anticuerpos policlonales) lo cual presenta muchas veces reactividad cruzada con antígenos no relacionados. Esta forma de desarrollo y producción tiene las ventajas de ser sencilla, de generar grandes cantidades de anticuerpos, pero tiene la gran desventaja de no ser un proceso estandarizable ya que diferentes animales producen diferentes anticuerpos, incluso un mismo animal a lo largo del tiempo (Bradbury & Plückthun, 2015).

Por otro lado, en 1960 Kohler y Milstein describieron la tecnología de producción de hibridomas, lo cual permitió producir millones de copias idénticas de un único tipo de anticuerpo de ratón específico para un antígeno de interés (Köhler & Milstein, 1975), lo cual dió lugar a los primeros anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los anticuerpos derivados de hibridomas también sufren problemas de reactividad cruzada y estandarización de producción a lo largo del tiempo debido a que sufren mutaciones, inestabilidad cromosómica (Couture & Heath, 1995; Merritt & Palsson, 1993). Es frecuente observar la muerte de estas células, lo cual frecuentemente lleva a la pérdida de la capacidad de producción del anticuerpo en el tiempo (Bradbury & Plückthun, 2015). En el 2015 más de 110 científicos de diferentes países, altamente destacados en sus respectivas áreas, firmaron una carta haciendo de conocimiento público que la investigación a nivel mundial atravesaba desde hacía años, serios problemas de reproducibilidad de experimentos realizados con anticuerpos poli y monoclonales (Bradbury & Plückthun, 2015) provistos por empresas productoras de reactivos para las ciencias de la vida. Esto resultó en un punto de crisis en relación a este problema y en la carta mencionada se propuso que todos los anticuerpos que se utilizan para la investigación fuesen de origen recombinante, para disponer de una fuente pura de anticuerpo, de una secuencia codificante para el mismo conocida y de un proceso de producción altamente estandarizado (Bradbury & Plückthun, 2015).

Mediante técnicas de Biología Molecular se pueden producir fragmentos de anticuerpos monoclonales recombinantes a través de la tecnología de Phage Display (Roth et al., 2021; Schirrmann et al., 2011). Sin embargo, dentro de los anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden ser producidos en forma recombinante en bacterias o levaduras, los derivados de anticuerpos convencionales como los Fab o ScFv, presentan problemas de rendimiento ya que tienen tendencia formar agregados y precipitar (Wörn & Plückthun, 2001). Al mismo tiempo la construcción de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos convencionales es muy laboriosa, las especificidades de clones originales se pierden en el proceso de construcción de las mismas lo cual se conoce como "reshuffling" de los genes codificantes para los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas (M. M. Harmsen & De Haard, 2007). En los años noventa se

encontró que una importante fracción de los anticuerpos del suero de camellos no presentaba la estructura básica de los anticuerpos y carecía de cadena liviana (Hamers-Casterman et al., 1993).

En relación a la temática de este proyecto, desarrollo de inmunoensayos para cuantificar toxinas y desarrollo de estándares para realizar tests de potencia para las toxinas de interés, se plantea generar ambos basados en el uso de nanobodies específicos para las toxinas de interés. Éstos no presentan los problemas de reactividad cruzada que afectan principalmente a los anticuerpos policlonales (aunque también a los monoclonales clásicos) y son producidos en condiciones altamente controladas en el laboratorio. También constituyen un sistema de producción infinito en el tiempo, lo cual asegura un proceso de producción altamente estandarizable. En relación a los formatos recombinantes derivados de fragmentos de anticuerpos convencionales los nanobodies presentan varias ventajas entre las que se encuentran:

- la construcción de bibliotecas es de menor complejidad y no sufre "reshuffling" no necesitando de bibliotecas de altísima diversidad para desarrollarlos
- se producen en mayores cantidades que los Fab o ScFv
- son más estables que los Fab o ScFv lo cual los hace ser reactivos altamente robustos.

Basados en esta tecnología desarrollaremos los nuevos estándares y kits para control de potencia.

Descripción del Proyecto:

Para el desarrollo tanto de estándares para ensayos de potencia, como de inmunoensayos para la cuantificación in vitro de las toxinas, se plantea en primera instancia desarrollar nanobodies específicos para las toxinas de interés. Para el desarrollo de estándares recombinantes es indispensable que los nanobodies seleccionados sean neutralizantes de la actividad de las toxinas. En cambio, para los nanobodies a ser utilizados en inmunoensayos se pueden utilizar tanto nanobodies neutralizantes como no neutralizantes. A continuación se describe la estrategia para desarrollar inmunoensayos para la cuantificación de las toxinas como estándares recombinantes para ensayos de potencia de vacunas.

INMUNIZACIÓN DE LLAMAS, CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE NANOBODIES Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS O FRAGMENTOS DE LAS MISMAS.

Para esto, Bentenbiotech cuenta con llamas para ser inmunizadas y los protocolos de Inmunización ya han sido aprobados por la CHEA. Las llamas serán inmunizadas con una vacuna para Clostridios comercial (estas ya han sido

Las llamas serán inmunizadas 2 veces con la vacuna Clostridial de Zoetis Fortress 8, dejando un mes entre cada vacunación. Para la extracción de sangre se seguirá el protocolo aprobado por la CHEA. Una vez extraída la sangre se procesará mediante un gradiente de Ficoll en el cual se separan las células mononucleares del resto, como hemos realizado previamente (Martín A. Rossotti et al., 2015). Una vez aisladas las células se realizará una extracción de ARN, síntesis de ADNc y amplificación de genes variables de inmunoglobulinas y construcción de la biblioteca de nanobodies como lo hemos realizado previamente en el vector pCOMB3x (MA et al., 2015; Martín A. Rossotti et al., 2015; Scarrone et al., 2021).

2) Producción de toxinas recombinantes en E.coli: beta y épsilon (C. Perfringens de tipo C y D) y alfa (C. Septicum).

Las toxinas se producirán de forma recombinante utilizando el sistema de células BL21 y vectores basados en expresión con promotores para la T7 RNA polimerasa. En el anexo se describe en detalle la estrategia para la producción de las mismas.

3) Selección de nanobodies específicos para las toxinas en fagos filamentosos (panning) y screening de clones positivos.

Para la selección se inmovilizarán las toxinas o fragmentos de las mismas biotiniladas en pocillos de placas de ELISA, previamente sensibilizados con estreptavidina comercial a 2 µg/mL en PBS 1x y bloqueados con BSA al 1% en PBS 1x. Posteriormente se adicionarán 100 µl de la biblioteca de fagos por pocillos y se seguirán pasos de incubación, lavados, elución y amplificación de clones específicos como hemos realizados anteriormente (MA et al., 2015; Martín A. Rossotti et al., 2015; Scarrone et al., 2021). El screening de clones productores de nanobodies específicos se realizará utilizando pocillos con estreptavidina y con la toxina. Se transferirán sobrenadantes de cultivos de clones individuales y se visualizarán con un anticuerpo comercial anti-6xHis conjugado a peroxidasa (Roche, número de catálogo 11922416001). Como control se utilizarán pocillos sin toxina para confirmar que la señal es específica de la presencia de la toxina.

4) Transferencia en masa de secuencias de ADN codificantes para nanobodies específicos para las toxinas, a un sistema de expresión robusto. Screening de clones positivos en dicho sistema.

Con los fagos obtenidos de la segunda ronda de selección se infectarán células ER2738 y se las crecerá en presencia de ampicilina seleccionando el crecimiento de las células infectadas. Al otro día se realizarán minipreps del ADN

correspondiente al vector fagémido pCOMB3X. Este vector contendrá una población de secuencias de ADN codificantes para nanobodies específicos para las toxinas o fragmentos de estas. Posteriormente se digerirá el fagémido con la enzima de restricción Sfil, la cual libera fragmentos de ADN codificantes para los nanobodies de interés (~450 pb, estos fragmentos se purificarán luego de ser separados en geles de agarosa al 1%) y se ligarán en un vector pET28a+ modificado, pLEMB-HA (ver figura 1 del Anexo), cortado con Sfil. El mismo permite el clonado directo de los nanobodies con la enzima Sfil, expresión periplásmica de los mismos fusionados a etiquetas 6xHis y epítotope HA. Luego de transformar células BL21 con la mezcla de ligación se plaquearán en placas de LB Agar con kanamicina. Al día siguiente se tomarán colonias individuales para crecer cultivos en medio líquido y realizar un segundo screening para confirmar que se transfirieron correctamente las secuencias codificantes para los nanobodies de interés, como hemos descrito anteriormente (Martín A. Rossotti et al., 2015; Martin A Rossotti et al., 2015; Scarrone et al., 2021). Se realizará un screening de 10 clones por toxina o su fragmento de toxina y se obtendrán sus secuencias por secuenciación.

5) Identificación de clones de alta expresión/afinidad como agentes de captura.

Para esto se seguirá la estrategia descrita por la Dra Triana Delfín (Delfin-Riela, Rossotti, Alvez-Rosado, et al., 2020; Delfin-Riela, Rossotti, Echaidés, et al., 2020). Brevemente se crecerán clones en placas de pocillo hondo y se inducirá la expresión de los nanobodies, como se mencionó anteriormente y se dejarán hasta el otro día. Al día siguiente se centrifugará la placa y el sobrenadante se transferirá a otra placa. Con estos sobrenadantes se realizarán 3 ELISAs con muy bajas concentraciones de antígeno (0,5; 5 y 100 ng/mL) de forma de identificar clones que presenten mayores señales, como se reportó anteriormente. Uno de estos clones será clonado en el vector pLEMB-biot, para cada toxina y será producido biotinilado y purificado para ser utilizado como agente de captura.

6) Expresión y biotinilación in vivo de clones seleccionados para screening en formato de alto rendimiento, de pares de nanobodies capaces de formar "sandwichs" con las toxinas.

Utilizando la información de secuencias codificantes para los nanobodies en combinación con la expresión de clones de mayor expresión se seleccionará 1 clon, para cada toxina, los cuales serán clonados en el vector pLEMB-biot (Figura 1, Anexo). Éstos serán producidos de la misma forma que se mencionó anteriormente para generación de las toxinas biotiniladas. Para la evaluación de los mejores pares de "sandwichs" de nanobodies en formato de alto rendimiento se seguirá la estrategia reportada previamente (Delfin-Riela, Rossotti, Alvez-Rosado, et al., 2020; Delfin-Riela, Rossotti,

Echaidés, et al., 2020; Martín A. Rossotti et al., 2015) basada en ELISAs. Brevemente, los nanobodies biotinilados serán inmovilizados en 96 pocillos de una placa de ELISA previamente sensibilizada con estreptavidina. Una vez inmovilizados éstos servirán para capturar las toxinas a partir de diluciones en PBS-Tween de filtrados clostridiales conteniendo las toxinas los cuales, se encuentran en la empresa Bentenbiotech. Luego de lavar los pocillos se transferirán lisados de cultivos de los clones expresados en la cepa BL21 como se ha descrito previamente (Delfin-Riela, Rossotti, Alvez-Rosado, et al., 2020; Delfin-Riela, Rossotti, Echaidés, et al., 2020; Martín A. Rossotti et al., 2015). Estos clones son cultivados en medio LB líquido con kanamicina en placas de 96 pocillos hondos. Esto permite el screening de unos 90 clones en simultáneo. Los nanobodies "secundarios" serán revelados con un anticuerpo comercial anti-HA conjugado a peroxidasa. Como se muestra en la Figura 2 del Anexo es de esperar que diferentes combinaciones generen diferentes intensidades de señal, los pares que den las señales más altas serán candidatos para continuar en el siguiente punto.

7) Expresión y purificación de nanobodies seleccionados y desarrollo de ELISAs "sándwich".

Los clones que presenten mayores señales en combinación con el nanobody de captura serán seleccionados para ser expresados en la cepa BL21 y purificados por IMAC. Utilizando el formato mencionado anteriormente se desarrollarán ELISAs sándwich utilizando las toxinas purificadas producidas previamente y cuantificadas: beta y épsilon de *C. Perfringens*, Alfa de *C. Septicum* como estándares. De esta forma se realizarán curvas de calibración y se podrá determinar cuál par de anticuerpos da lugar al ELISA con mayor sensibilidad. Todos estos pasos se realizarán en buffer PBS 1x-Tween 20 0.05% (PBST) como se ha descrito anteriormente (Delfin-Riela, Rossotti, Echaidés, et al., 2020; Martín A. Rossotti et al., 2015) y dará lugar a un prototipo del ensayo. Como parámetros de sensibilidad del ensayo se tendrá en cuenta el Límite de detección (concentración de toxina que genera un 5% de la señal máxima) y el SC50 (concentración de toxina con la cual se alcanza un 50% de la señal máxima). Estos ensayos se realizarán por triplicado.

8) Estudio del efecto matriz y validación del ensayo.

Una vez determinado los pares de nanobodies que den lugar a los ELISAs de mayor sensibilidad, se procederá a realizar el ensayo en muestras de matrices biológicas relevantes como son filtrados de cultivos clostridiales provenientes de fermentadores, los cuales serán provistos por Bentenbiotech. Para esto se utilizarán filtrados de cultivos clostridiales productores de toxinas no relacionadas, en particular, de *Clostridium Tetanicum* o *Botulinum*. Se asumirá que el filtrado del cultivo proveniente de *C. Tetanicum* o *Botulinum* representará una matriz de complejidad

equivalente al de los Clostridios de este proyecto, como para estudiar el efecto de la matriz en el ensayo. Al mismo tiempo se confirmará que los nanobodies seleccionados no presentan reactividad con la Toxina tetánica o Botulínica. Esto se realizará por ELISA utilizando toxina tetánica purificada disponible de la empresa SigmaAldrich (número de catálogo, T3194) o Botulínica disponible en Metabionics. Finalmente realizando curvas estándar en diluciones de los filtrados de los cultivos podrá establecerse en qué dilución de la matriz no se observa efecto, en caso de existir. Los ensayos serán finalmente validados con filtrados clostridiales como se describe en el Anexo I.

9) Adaptación del sistema a aglutinación de partículas de látex y evaluación del efecto matriz.

Los nanobodies que reconozcan epítopes no solapantes seleccionados en el punto 6 serán producidos biotinilados y purificados para generar un sistema policlonal que favorezca la aglutinación de partículas de látex. Se utilizarán partículas de látex modificadas con carboxilato de 0.3 μM (Bangs Laboratories, número de catálogo PC00209) a las cuales se les conjugará estreptavidina comercial, siguiendo las especificaciones del fabricante. A estas partículas se les adicionarán cantidades iguales de cada uno de los nanobodies biotinilados de forma que las mismas queden recubiertas de nanobodies que reconozcan diferentes epítopes. Posteriormente se realizarán ensayos utilizando diferentes buffers con cantidades conocidas de las toxinas, para poner a punto el ensayo y determinar el límite y rango de detección. El ensayo será monitoreado por inspección visual. Este ensayo será validado posteriormente con los filtrados clostridiales inoculados con cantidades conocidas de las toxinas, a utilizar en la validación del ELISA.

10) Estudio del efecto neutralizante de las toxinas de nanobodies y desarrollo de los estándares recombinantes.

Los nanobodies producidos por los clones aislados en el punto 5 serán evaluados en ensayos de letalidad, premezclando la toxina con el nanobody, incubándolos y posteriormente siendo administrados a grupos de ratones. Dada nuestra experiencia previa con nanobodies neutralizantes para la toxina tetánica (Martin A Rossotti et al., 2015) se mezclarán unos 10 μg de nanobody biespecífico con 2 LD₁₀₀ de toxina, se incubará por una hora y se administrará a los ratones. Se esperará por un período de 96 horas para evaluar muerte o sobrevida. Aquellos nanobodies que confieran protección serán clasificados como neutralizantes. Este ensayo se realizará en la empresa por la M.Sc. Lucía Rodríguez. Posteriormente los nanobodies neutralizantes se clonarán en un vector conteniendo un nanobody específico para la Albúmina Sérica de Ratón (Silence, Karen. Lauwereys, Marc. Dreier, 2014), como fusión en C terminal de los nanobodies específicos para las toxinas. La secuencia de este nanobody está protegida por patente en algunos países, principalmente de Europa del este, pero no en Estados Unidos y el resto del mundo. Los nanobodies biespecíficos

serán expresados y purificados como se mencionó anteriormente, dando lugar a los estándares recombinantes, los cuales serán ensayados nuevamente junto a estándares internacionales de forma de reproducir la capacidad neutralizante del estándar policlonal utilizado en la actualidad con el estándar recombinante generado en este proyecto.

Otros Recursos :

Benten cuenta con un laboratorio de 120m² que cuenta con todo el equipamiento para realizar los ensayos propuestos en el proyecto a ser ensayados en Benten.

El laboratorio de Ecología Molecular del CURE en Rocha dispone de la infraestructura para llevar adelante este proyecto. Cuenta con un laboratorio de unos 60 m², centrifugas, micropipetas y micropipetas para placas de ELISA, un lector de placas de ELISA, espectrofotómetro, pH metro, heladeras, freezers de -20 y -80 grados, máquinas de PCR a tiempo final y en tiempo real, autoclave, equipos para electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida, balanzas, agitadores magnéticos, cabina de flujo de seguridad tipo A2, campana extractora de gases.

**OBJETIVOS**

Objetivo general:

El presente Proyecto tiene como objetivo generar nanobodies específicos para toxinas clostridiales de interés: y con los mismos desarrollar:

- 1) Inmunoensayos de tipo sándwich basados en nanobodies en formato de ELISA y aglutinación de partículas de Látex para la cuantificación de las toxinas en cultivos de fermentadores industriales.
- 2) Desarrollar estándares recombinantes basados en nanobodies neutralizantes de las toxinas para ser utilizados en ensayos para la determinación de la potencia inducida por vacunas en animales.

Objetivos específicos

Nº	Objetivo específico	Resultado esperado	Observaciones
1	Inmunización de llamas y obtención de nanobodies recombinantes a toxinas clostridiales	nanobodies recombinantes purificados específicos a 3 toxinas clostridiales	
2	Desarrollo de ensayos de latex y ELISA	Kits de ELISA y Latex validados en matriz real para la cuantificación de 3 toxinas clostridiales.	
3	Validación de antitoxinas recombinantes neutralizantes	Antitoxinas recombinantes estandarizadas para ensayos de neutralización de 3 toxinas clostridiales.	

PLAN DE TRABAJO

Actividad/Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
Immunización de llamas y construcción de bibliotecas de nanobody ...	X	X	X	X	X	X																																
Producción de toxinas recombinantes en E.coli ...	X	X	X	X	X	X																																
-Selección de nanobodies específicos ...							X	X	X	X	X																											
Screening de clones positivos en sistema de expresión robusto ...										X	X	X																										
Secuenciación de clones ...												X	X																									
Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 1 ...													X	X	X																							
Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sandw ..													X	X	X																							
Evaluación efecto matriz para Toxina 1 ...																X	X	X	X	X																		
Adaptación a latex para toxina 1 ...																X	X	X	X	X																		
Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 1 ...																X	X	X	X	X																		
Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 2 ...																					X	X	X															
Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sand ..																					X	X	X															
Evaluación efecto matriz para Toxina 2 ...																						X	X	X	X	X												
Adaptación a latex para toxina 2 ...																						X	X	X	X	X												
Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 2 ...																						X	X	X	X	X												
Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 3 ...																																			X	X	X	

Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sand ..	X X X
Evaluación efecto matriz para Toxina 3 ...	X X X X X X X
Adaptación a latex para toxina 3 ...	X X X X X X X
Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 3 ...	X X X X X X X

Descripción de las actividades:

Actividad	Mes inicio/fin	Es hito	Descripción	Observaciones
Inmunización de llamas y construcción de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos.	1/6	SI	Se realizará la inmunización de llamas con antígenos pertinentes al proyecto y se realizará la biblioteca de nanobodies en fagos filamentosos. Se obtiene como hito la biblioteca de nanobodies fagos filamentosos.	
Producción de toxinas recombinantes en E.coli	1/6	NO	Producción de toxinas recombinantes en E.coli: beta y épsilon (C. Perfringens) y alfa (C. Septicum).	


 -Selección de nanobodies específicos 6/10 SI Selección de nanobodies específicos para las toxinas en fagos filamentosos (panning) y screening de clones positivos. obtención de clones anti toxinas.
 Hito: Nanobodies específicos para las toxinas.

Screening de clones positivos en sistema de expresión robusto 10/12 NO Transferencia en masa de secuencias de ADN codificantes para nanobodies específicos para las toxinas, a un sistema de expresión robusto. Screening de clones positivos en dicho sistema.

Secuenciación de clones 12/13 SI Secuenciación de clones positivos e identificación de los mejores.
 Hito: secuencia de clones

Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 1 13/15 NO Screening en formato de alto rendimiento, de pares de nanobodies capaces de formar "sandwichs" para toxina 1.

Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sandwich	14/16	SI	7-Expresión y purificación de nanobodies seleccionados y desarrollo de inmunoensayos "sándwich" para toxina 1. Hito: pares de nanobodies purificados para sandwich.
Evaluación efecto matriz para Toxina 1	16/20	SI	Estudio del efecto matriz en la detección de la toxina 1. Validación del ensayo. Hito: Ensayo de detección de toxina 1 en matriz real validado.
Adaptación a latex para toxina 1	16/20	SI	Adaptación del sistema a partículas de látex y evaluación del efecto matriz para toxina 1. Hito: ensayo de latex para determinación de toxina 1 en matriz real validado.

Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 1	16/20	SI	Estudio del efecto neutralizante de nanobodies para el desarrollo de estándares recombinantes. Hito, antitoxinas recombinantes producidas en E. coli con capacidad neutralizante comparada con patrones tradicionales a Toxina 1.
Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 2	20/22	NO	Screening en formato de alto rendimiento, de pares de nanobodies capaces de formar "sandwichs" para toxina 2
Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sandwich toxina 2	21/23	SI	Expresión y purificación de nanobodies seleccionados y desarrollo de inmunoensayos "sándwich" para la toxina 2. Hito; pares de nanobodies purificados para sandwich de toxina 2.
Evaluación efecto matriz para Toxina 2	23/27	SI	Estudio del efecto matriz en la detección de la toxina 2. Validación del ensayo. Hito: Ensayo de detección de toxina 2 en matriz real validado.

Adaptación a latex para toxina 2	23/27	SI	Adaptación del sistema a partículas de látex y evaluación del efecto matriz para la toxina 2. Hito: ensayo de latex para determinación de toxina 2 en matriz real validado.
Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 2	23/27	SI	Estudio del efecto neutralizante de nanobodies para el desarrollo de estándares recombinantes. Hito, antitoxinas recombinantes producidas en E. coli con capacidad neutralizante comparada con patrones tradicionales a Toxina 2.
Selección de pares de nanobodies afines a la toxina 3	27/29	NO	Screening en formato de alto rendimiento, de pares de nanobodies capaces de formar "sandwichs" para toxina 3

Expresión y purificación de pares de nanobodies para ensayos sandwich toxina 3	28/30	SI	Expresión y purificación de nanobodies seleccionados y desarrollo de inmunoensayos "sándwich" para la toxina 3. Hito; pares de nanobodies purificados para sandwich de toxina 3.
Evaluación efecto matriz para Toxina 3	30/36	SI	Estudio del efecto matriz en la detección de la toxina 3. Validación del ensayo. Hito: Ensayo de detección de toxina 3 en matriz real validado.
Adaptación a latex para toxina 3	30/36	SI	Adaptación del sistema a partículas de látex y evaluación del efecto matriz para la toxina 3. Hito: ensayo de latex para determinación de toxina 3 en matriz real validado.

Desarrollo de estándares recombinantes a toxina 3	30/36	SI	Estudio del efecto neutralizante de nanobodies para el desarrollo de estándares recombinantes. Hito, antitoxinas recombinantes producidas en E. coli con capacidad neutralizante comparada con patrones tradicionales a Toxina 3.
---	-------	----	---

VIABILIDAD COMERCIAL Y ECONOMICA DEL PROYECTO

Análisis de la Demanda:

da:

Hemos constatado un incremento de la demanda de las empresas productoras de vacunas veterinarias por :

- A) Estándares para la cuantificación de toxinas y test de potencia
- B) Sistemas de cuantificación de antígenos protectores in vitro y en tiempo real

En nuestro análisis de las causas involucradas en esta modificación del comportamiento del mercado hemos constatado que la entrada en vigencia de nuevos controles por parte de las autoridades sanitarias de diferentes países provoca en forma inmediata un aumento de la demanda por reactivos, insumos y servicios que les permitan a las empresas cumplir con esta nueva normativa.

Por otro lado la necesidad de generar información de los procesos han creado una demanda por sistemas que permitan cuantificar los antígenos protectores en forma más

simple, rápida, económica y que permita incrementar la capacidad de muestreo. Los sistemas tradicionales de titulación requieren ratones lo cual ya de por sí es una limitante tanto económica como de capacidad de muestreo debido a que para disponer de ratones suficientes de 18 a 22 gramos acorde a la normativa de las farmacopeas su producción debe ser planificada con meses de antelación y carece de flexibilidad para el aumento de número de muestras a analizar..

Además de ser un sistema que está quedando obsoleto, es caro insume mucho tiempo y lo más importante la información que genera no permite tomar acciones en los procesos ya que los resultados se obtienen entre 48 a 72 hr de realizada la prueba.

Para las empresas de producción de vacunas veterinarias es un cambio drástico en su operativa diaria el poder contar con un proveedor tanto de reactivos estándar que hoy son el Gold Test así como de sistemas de cuantificación in vitro validados listo para usar.

Análisis de la Oferta:

Por otro lado la oferta está restringida,

a) NISBC de la OMS, donde exclusivamente se provee exclusivamente de antitoxinas estándares internacionales, incluso han discontinuado ya su estándar internacional para la toxina letal de *C. sordellii*. Hemos realizado gestiones sobre esta disrupción de suministro y no hay al día de hoy certeza de que este estándar esté disponible en el mercado en el futuro inmediato.

b) El USDA APHIS de los Estados Unidos, desde hace más de 3 años este organismo no provee más estándares a empresas fuera de los Estados Unidos. Anteriormente era una fuente de reactivos estandarizados y algunos sistemas de cuantificación in vitro. Las consultas realizadas con el Dr Paul Hauer (Director-Policy, Evaluation and Licensing) confirmaron que este escenario se mantendrá en el futuro.

c) MAPA LANAGRO es la autoridad responsable entre otros cometidos del control de los biológicos veterinarios de Brasil, también este centro era un proveedor de algunas

toxinas y antitoxinas estandarizadas empleadas en los test de potencia. Desde hace ya algunos años a discontinuado el suministro para empresas del exterior e incluso las empresas de Brasil no siempre disponen de estos reactivos

Análisis de la Estrategia de Comercialización, Promoción y Publicidad:

Hasta el momento se han utilizado las herramientas de difusión empleadas han sido a través de LinkedIn y Google Ads., teniendo un impacto drástico en el tráfico de internet en esta plataforma (Incremento por 100) cada vez que Benten Biotech publica información sobre estándares generando nuevos contactos solicitando información, cotización y concretándose nuevas ventas.

En esta nueva etapa se realizara:

A la medida que los diferentes productos del presente proyecto alianza se vayan obteniendo se comenzara su comercialización. La estrategia de comunicación es la siguiente

- 1) Cada nuevo producto será incorporado a la página web de Benten Biotech, en la sección de productos con un destaque en la página principal y un link al producto en si.
- 2) Empleando nuestra base de datos se contactara a todos los clientes, y empresas que nos han consultado durante estos 5 años comunicando el lanzamiento de los nuevos productos
- 3) Se realiza una campaña empleando herramientas de y LinkedIn Google Ads con el fin de direccionar las ofertas hacia la captación de nuevos clientes debidamente sectorizados.
- 4) Postulación ante EDQM de los estándares recombinantes y de los kits in vitro, para ser validados por la Ph. Eur.

Se diseñaran paquetes de kits y reactivos así como un sistema de descuentos ante futuras compras con el objetivo de incrementar el volumen de venta por cliente.

IMPACTOS

Impactos financieros, sociales y medioambientales:

Hemos sufrido recién en este 2021 el efecto de la pandemia, mientras que durante el 2020 con todos los países tomando medidas de cuarentena y la economía fuertemente golpeada Benten Biotech cumplió sus metas de crecimiento y facturación, la cual durante 4 años hemos duplicado en forma sistemática.

La línea de negocios de control de calidad de vacunas según lo proyectado al cierre del 2021 tendrá una facturación próxima a los 100 mil dólares con un 80% de colocaciones en el exterior.

El nuevo impulso que obtendremos con este proyecto nos permitirá mantener nuestra tasa de crecimiento de facturación con una mejor estructura de costos representando estos del 10 al 30% del precio del producto dependiendo del mismo.

Las proyecciones económicas realizadas son conservadoras y se basan en los actuales clientes (37 en 8 países) los cuales al ser consultados han manifestado su intención de compra al precio propuesto por un set de reactivos y kits para las diferentes valencias.

Premisas del análisis.**LATEX**

40ul por determinación

5U\$\$ por determinación

500 determinaciones/20ml

KIT 2500U\$\$/20ml

ELISA Ag

5 placas por KIT

750U\$\$/placa

3750U\$\$/kit

En los documentos adjuntos se puede encontrar una proyección económica basada en esos supuestos.

Riesgos:

1.- Demoras en la entrega de materiales y equipamientos por parte de los proveedores contratados: Para mitigar este riesgo, se identificará una lista de proveedores calificados de modo de contar con alternativas de suministros y no depender de un solo proveedor.

2.- Escasez de Recursos Humanos con competencias especiales requeridas para la realización de un doctorado en el área: A los efectos de mitigar este riesgo, se realizará un llamado público muy bien publicitado

Principales Riesgos del Negocio (Años 1 y 2):

1.- Demora de los desarrollos de los productos y/o la falla en el desarrollo y producción de las mismas. Para mitigarlos, se comenzará por los productos que para Benten son de bajo riesgo de fracaso en su desarrollo para asegurar las primeras ventas.

2.- No alcanzar los objetivos de ventas y de facturación planificados de autovacunas para los primeros dos años. Para mitigarlo, se reforzará la comunicación publicitaria, haciendo referencia a los clientes actuales.

3.- Fluctuaciones en los precios del mercado. Si bien es cierto que los anticuerpos monoclonales recombinantes y las soluciones planteadas aquí son productos innovadores, existen tanto compañías competidores cercanos y productos sustitutos y que podrían influenciar los precios de aquellas. En ese sentido, la estrategia de mitigación se enfocaría en la diversificación de mercados y en rapidez en el desarrollo de los productos para estar por delante de la competencia. En este sentido la alianza con el Dr. González es fundamental para la mitigación del riesgo.

4.- En cuanto al riesgo asociado a la competencia, actualmente no estamos identificando competidores a nivel regional y tampoco estaríamos identificando competencia en Brasil.

Estrategia de Sustentabilidad Post-Proyecto:

El proyecto contempla el desarrollo de productos comercializables, los ingresos por ventas de estos productos generarán en el mejor de los casos dividendos que permitan mantener el I+D+i y el desarrollo en conjunto con el laboratorio del Dr. Gonzalez, la cantidad de productos y derivaciones basadas en la plataforma de generación de conocimiento que se montará en el CURE es muy amplia y si se tiene éxito a nivel comercial su financiación es fundamental para aumentar de forma continua el portafolio y la complejidad de los proyectos.

Benten tiene planificada avanzar hacia una planta de producción de estos biológicos si se tiene éxito comercial.

Viabilidad legal y ambiental (si corresponde):

Los reactivos y kits incluidos en el presente proyecto no se encuentran bajo regulación, al tratarse de productos validados in house las autoridades sanitarias de los diferentes países toman como válida la información aportada por las empresas donde validan sus resultados. Benten Biotech ha exportado a diferentes países en Europa, Asia y LATAM reactivos (Toxinas y Antitoxinas estandarizadas) con los permisos correspondientes para su exportación e importación los cuales son otorgados por las autoridades sanitarias correspondientes del país destino. En principio se comercializarían como "Research Use Only". En el caso que se identifiquen negocios de porte suficiente para aplicaciones reguladas se evaluará caso a caso para pasar a etapas de validación para registro en mercado objetivo.

IMPACTO AMBIENTAL

Impacto ambiental: No requiere Autorización Ambiental Previa

PRESUPUESTO POR RUBRO**Adecuación edilicia**

Descripción	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:			0

Equipamiento laboratorio

Descripción	Cantidad	Tipo	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:					0

Otros equipos

Descripción	Cantidad	Tipo	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:					0

Material bibliográfico

Descripción	Cantidad	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Materiales e insumos

Descripción	Cantidad	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Software y licencias

Descripción	Cantidad	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Personal técnico

RRHH	Rol	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Triana DELFIN RIELA	Investigador	457.485	0	457.485
Lucía RODRIGUEZ CALLERIZA	Investigador	1.372.455	0	1.372.455
Total UYU:				1.829.940

Consultores

RRHH	Rol	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Capacitación

RRHH	Rol	Organización	Descripción	Duración	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
------	-----	--------------	-------------	----------	-------------------	---------------	-------

Total UYU: 0

Servicios

Descripción	Duración	Proveedor	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Servicios de I+D+i	1095	CURE-UDELAR	4.955.775	0	4.955.775
Total UYU:					4.955.775

Viáticos y estadías

RRHH	Rol	Destino	Duración	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:						0

Propiedad intelectual

Descripción	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:			0

Otros costos

Descripción	Cantidad	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Imprevistos

Descripción	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
imprevistos 5% del valor del proyecto	357.142	0	357.142
Total UYU:			357.142

Promoción y difusión

Descripción	Cantidad	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:				0

Pasajes

RRHH	Rol	Destino	Duración	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Total UYU:						0

TOTALES POR RUBRO

Rubro	Cargo al Proyecto	Otros aportes	Total
Adecuación edilicia	0	0	0
Equipamiento laboratorio	0	0	0
Otros equipos	0	0	0
Material bibliográfico	0	0	0
Materiales e insumos	0	0	0
Software y licencias	0	0	0
Personal técnico	1.829.940	0	1.829.940
Consultores	0	0	0
Capacitación	0	0	0
Servicios	4.955.775	0	4.955.775
Viáticos y estadías	0	0	0
Propiedad intelectual	0	0	0
Otros costos	0	0	0
Imprevistos	357.142	0	357.142
Promoción y difusión	0	0	0
Pasajes	0	0	0
Total UYU	7.142.857	0	7.142.857

CRONOGRAMA DE EJECUCIÓN

Rubro	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4	Semestre 5	Semestre 6
Personal técnico	304.990,00	304.990,00	304.990,00	304.990,00	304.990,00	304.990,00
Servicios	1.700.000,00	1.150.000,00	526.443,00	526.443,00	526.443,00	526.446,00
Imprevistos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	357.142,00
Total UYU:	2.004.990,00	1.454.990,00	831.433,00	831.433,00	831.433,00	1.188.578,00

ADJUNTOS

Certificado DGI (Certificado DGI)

Carta aval (carta aval benten)

Carta aval (carta aval cure)

Carta aval (carta aval química)

CV (cv Esteban Guerra)

CV (cv Rodriguez)

CV (cv triana)

Otros (intención de compra CZ vaccine)

Otros (Bibliografía)

Otros (Anexo sección metodología)

Proyección de Ingresos (proyección de ingresos)

Estados contables de la empresa (estados contables 2019)

Convenio de vinculación (convenio de vinculacion)

Estados contables de la empresa (estados contables 2018)

Estados contables de la empresa (estados contables 2020)

Evaluación Financiera (planilla evaluación financiera)

Certificado BPS (certificado BPS)

Otros (ANEXO II aportes de las partes)

Otros (Anexo I al convenio de vinculación)

Exportador de : ART_X_2021_1