



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA - FACULTAD DE QUÍMICA
LABORATORIO PRONDIL MSD - DEPARTAMENTO BIOTECHNOLOGY
SOLUTIONS

Estabilización del proceso productivo a nivel industrial de *Clostridium novyi* tipo B

Tesina de Grado
Licenciatura en Química

María Ximena Ures Vidal

4.092.917-1

Tutores:

Dra. Iris Miraballes, Facultad de Química, Instituto Polo Tecnológico de Pando,
Laboratorio de Biotecnología, Dpto. Bioquímica Clínica- Inmunología.

Dr. Julio Guarnaschelli, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, Departamento de
Desarrollo Biotecnológico/Laboratorio Prondil MSD, Departamento Bio Technology
Solutions.

Febrero 2023 - Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

Al ver el desarrollo y los resultados alcanzados de este proyecto plasmados en la Tesis, me emociona y me recuerda que este trabajo es el fruto de un esfuerzo enorme. Representa muchos años de dedicación, no solo a nivel académico, también una gran dedicación a nivel laboral, y sobre todo significa un importante logro personal. Con este trabajo concluye una carrera que soñaba desde pequeña, esto bien lo entenderán mis padres, quienes me regalaron mi primer juego de química y microscopio en mis primeros años de escuela, dado que yo ya desde muy pequeña decía “Voy a ser Científica”.

Con los años también he aprendido a agradecer, por lo cual dentro de este trabajo académico genero este espacio más personal y que sale del corazón.

Quiero agradecer a mis padres, quienes con mucho esfuerzo y amor me apoyaron siempre, a mí y a mis hermanas, poniéndonos en primer lugar para que nunca nos faltara nada y que siempre contáramos con las mejores oportunidades posibles. Mamá, Papá: ¡Gracias! ¡Este trabajo y esta carrera está dedicada completamente para Uds.!

También quiero agradecer especialmente a mi esposo, Gabriel, sin ti estos últimos años de dedicación absoluta al trabajo y la Facultad no hubiesen sido posibles, tu amor incondicional y tu apoyo me dieron lugar y soporte para poder culminar la carrera.

Agradezco a mis Tutores, Iris y Julio, primero por tener la amabilidad de aceptarme como estudiante, por creer en el valor de este proyecto, por la paciencia y el tiempo invertido. Iris, gracias por haberme dedicado tiempo de calidad y compartir conmigo tu formación de una forma tan dulce. Julio, gracias por tantos años compartidos en Prondil, por haber confiado en mí cuando te entregue mi currículum allá por el 2015, por haber sido parte fundamental de mi formación en la Industria, siempre enseñándome de una forma libre para que yo aprendiera a desenvolverme, pero siempre estando allí apoyándome.

Este esfuerzo también va dedicado especialmente al gerente de mi Departamento, mi jefe, Pablo Esposito, tu apoyo fue sin duda un valor importantísimo para que yo terminara la carrera. En un momento en el que había perdido un poco el foco, tus palabras y sobre todo tu soporte me ayudaron a encausar, me permitiste reasignar mis prioridades para que le diera el valor justo a la carrera. Gracias por confiar en mí y en mi trabajo, ayudándome a crecer y dándome siempre oportunidades, tu forma de liderar es la excelencia.

También quiero agradecer a nuestra directora de Departamento, Olga D'Hennezel y al Laboratorio Prondil MSD, por brindarme el espacio y el proyecto para desarrollar la Tesis, por confiar y apostar a mi formación. Prondil MSD es realmente mi segunda casa, y todo el personal de planta, laboratorio y oficinas forman un grupo humano destacable que siempre me hacen sentir entre amigos.

Terminado, quiero agradecer a mis primeros tutores académicos, mis primeros jefes y grandes docentes: Jenny Saldaña, Laura Domínguez y Martín Breijo, hoy estoy muy orgullosa de mi formación y de donde estoy, y parte de eso es por Uds., que me incluyeron en sus proyectos y me permitieron formarme en tantos aspectos, como química, experimentación, investigación, biología molecular, etc. ¡Gracias!

Por último, pero no menos importante, a mis amigos, los de siempre y los que fui sumando durante la carrera laboral, junto a Uds. las experiencias de vida son más lindas.

Contenido

1. Introducción	4
1.1. Presentación	4
1.2. Taxonomía y epidemiología <i>Clostridium novyi</i> tipo B	4
1.3. Producción industrial de <i>C. novyi</i> tipo B en MSD Montevideo	5
1.4. Métodos clásicos de detección y cuantificación	7
1.4.1. Titulación por Dosis Letal 50%	7
1.4.2. Test de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay)	10
1.5. Antecedentes del problema planteado	12
2. Objetivos	16
2.1. Hipótesis	16
2.2. Objetivos generales	17
2.3. Objetivos específicos	17
3. Materiales y métodos	17
3.1. Cepa de trabajo	17
3.2. Nuevos métodos desarrollados de detección y cuantificación	17
3.2.1. Inmunodifusión radial (IDR)	17
3.2.2. Cromatografía de inmuoafinidad	21
3.2.2.1. Anticuerpos monoclonales y Columnas de Cromatografía	22
3.2.2.2. Fast protein liquid chromatography (FPLC): Equipo ÄKTA Go™	23
3.2.2.3. Método de Aplicación FPLC:	24
4. Discusión y Resultados	29
5. Conclusiones	60
6. Perspectivas	61
7. Referencias	62

1. Introducción

1.1. Presentación

En las instalaciones Prondil - Merck Sharp & Dohme LLC, sitio Montevideo, Uruguay (de ahora en más Prondil MSD) se fabrican tres categorías diferentes de vacunas bacterianas: Clostridiales, Pasteurellas y Ántrax, siendo la planta asimismo responsable de la producción de dichos antígenos con capacidad inmunogénica.

Todos los bioprocesos llevados a cabo para la producción de los antígenos y la subsiguiente fabricación de vacunas siguen estrictos protocolos de calidad y seguridad. Los procesos de producción a gran escala comienzan con la fabricación de los medios industriales y la producción de cultivos a pequeña escala, conocidos como *semilla*, que en su última etapa serán usados para la inoculación de fermentadores de hasta 3000 litros de capacidad, donde la fermentación principal tiene lugar y comienza propiamente la producción a escala industrial de la toxina deseada. Una vez que el proceso productivo es completado y el cultivo bacteriano es inactivado, se continúa con la etapa de acondicionamiento del antígeno, conocida como etapa “*down-stream*”, donde los anacultivos son concentrados y clarificados, obteniéndose así el toxoide final que estará disponible para las formulaciones. Destacamos que cuando hablamos de Toxoide se hace referencia a la Toxina luego del proceso de inactivación.

De los más de 20 tipos distintos de formulaciones producidas en Prondil MSD, el 50% incluyen antígeno de *Clostridium novyi* tipo B, lo que lo convierte en un producto de gran importancia para la empresa.

1.2. Taxonomía y epidemiología *Clostridium novyi* tipo B

Clostridium novyi tipo B (*C. novyi* tipo B) es una bacteria anaerobia y esporulada responsable de causar *Hepatitis necrótica infecciosa* (INH, *infectious necrotic hepatitis*), conocida como *Black disease*, la cual afecta principalmente al ganado ovino, aunque también se ha identificado en bovinos, caprinos, suinos y equinos.¹

Esta bacteria produce una poderosa toxina conocida como *toxina alfa*, responsable de la ya mencionada patología hepática necrosante, a la que se suma un importante daño al sistema vascular, resultando a menudo en casos fatales.

Las esporas de *C. novyi* tipo B ingresan al individuo en forma natural por medio de los alimentos (pasturas, granos, etc.) y llegan al hígado desde los órganos gastrointestinales por la circulación porta hepática. Allí, las esporas son fagocitadas y pueden permanecer en estado de latencia dentro del citoplasma de los macrófagos hepáticos por muchos meses. Es de destacar que esta patología frecuentemente está asociada a una coinfección con el parásito *Fasciola hepática*, el que genera un ambiente anaeróbico local y necrosante, que favorece la multiplicación y desarrollo del clostridio.¹

Los signos clínicos son difíciles de identificar debido a la naturaleza violenta y fulminante de la enfermedad, donde la muerte del hospedador ocurre en menos de 24 horas, lo que complejiza la

posibilidad de establecer un tratamiento. Por lo tanto, la inmunización preventiva ocupa un papel primordial en el combate a esta enfermedad.²

Para lograr la protección frente a la acción de la toxina de *C. novyi* tipo B en animales susceptibles, los productores cuentan con un plan de vacunación que implica el uso de formas inactivadas de la toxina, es decir, formulaciones fabricadas con toxoides precipitados en sales de aluminio, capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.^{3,4}

1.3. Producción industrial de *C. novyi* tipo B en MSD Montevideo

Para cada producción industrial en Prondil MSD se planifican lotes de 3000L, por lo que previo al cultivo se deben fabricar 3000L de medio de cultivo conocido como *Moedema 13*. Este es un medio definido que se prepara totalmente a nivel de planta y está compuesto por las siguientes materias primas:

- Hidrolizado de proteína obtenido a partir de carne de caballo
- Hidrolizado de hígado vacuno
- Extracto de levadura
- Tioglicolato de sodio
- L- glutamina
- L- triptofano
- Fosfato de potasio monobásico
- Fosfato de potasio dibásico
- Clorhidrato de L-cisteína
- Fructosa
- Agua purificada

Una vez formulado el medio, éste es clarificado y filtrado usando poro de 0,2 micras. Del mismo medio industrial, y de forma aséptica, se toman los volúmenes necesarios para acondicionar los medios destinados a semilla en tubos de vidrio de 20 mL y en frascos de vidrio de 200 mL, ambos acondicionados previamente con carne picada, así como también medio para balones plásticos de 20 L, pero en este caso sin carne picada. Tanto tubos, como frascos y balones pasan por un proceso de desoxigenación en autoclave inmediatamente luego de ser acondicionados.

El proceso de producción de cada lote se inicia con cultivos de pequeña a media escala, lo que llamamos *cultivos semilla*, que implican una serie de pasajes coordinados partiendo desde la ampolla inicial de Banco de Trabajo. El último de estos pasajes se utiliza como inóculo del medio de producción principal.

Brevemente, dado que será discutido en detalle más adelante en la sección 4, Fig. 15, se comienza con el primer pasaje, lo que llamamos *R1*, que corresponde a re suspender el contenido de la ampolla Banco de Trabajo en un tubo de 20 mL de medio *Moedema 13* con carne picada. El mismo, una vez sembrado, se incuba a 36°C durante 12 a 28 horas. Dentro del marco de estas horas y cuando se observa aparición de turbidez en el medio, presencia de gas y elevación de la carne, lo que evidencia el crecimiento del clostridio en el medio de cultivo, se toman 4 mL, solo del medio líquido crecido, para inocular los frascos de 200 mL de medio *Moedema 13* con carne. En total son 4 frascos, que son incubados a 36°C durante 6 a 12 horas, lo que se conoce como pasaje *R2*. Nuevamente cuando se

observa crecimiento del medio en el pasaje R2 evidenciando las mismas condiciones que en el tubo, se utiliza en esta oportunidad el total de volumen líquido de cada frasco para inocular de a un balón de 20L de medio *Moedema 13*, que como mencionamos anteriormente, medio sin carne, a este pasaje se conoce como R3. Los balones son entonces incubados a 36°C durante 12 a 24 horas.

Dado que durante la incubación del R3, los balones utilizados como recipiente no son traslucidos, como sí lo son los tubos y frascos, no es posible hacer un seguimiento del crecimiento del medio solo mediante observación, por lo que el tiempo total del cultivo se estima en función de un único muestreo luego de 12 horas de incubación, donde se evalúa mediante técnica de Gram la cantidad de bacilos por campo y se estima el estado de división celular. Si en este punto de la incubación se ven pocos bacilos sin división en el campo observado al microscopio, se decide incubar los balones hasta por lo menos completar 24 horas de incubación, en cambio si el Gram muestra buena división celular y pureza del cultivo, se detiene la incubación de balones y se procede a inocular el tanque industrial con el contenido de los 4 balones. Esta forma de “identificar” el fin de incubación de los balones implica una situación de no conformidad a nivel productivo dado que es una interpretación técnico dependiente y basada en la experiencia del operador.

La fermentación a nivel industrial se lleva a cabo a 36°C, de forma anaerobia, sin suministro de aire y sin agitación, y manteniendo siempre un filtro de venteo abierto ya que el cultivo genera gran cantidad de gas. Cada dos horas se agita por dos minutos para homogeneizar el cultivo y se toma una muestra para evaluar turbidez determinando la densidad óptica. A su vez, mediante agregados sucesivos de solución de NaOH 10N se mantiene el pH en un rango de 7.00-7.60. El cultivo tiene una duración aproximada de 24 a 48 horas en base a un histórico de producción.

Una vez determinado el momento de *Fin de Cultivo*, en base a un histórico de horas de producción que se discute más adelante, se toma una muestra de forma aséptica para prueba de pureza por control microbiológico en caldos de *Fluido de Tioglicolato* y *Soja Trypticase*, así como en placas de *Agar Triptona-Soja*, controles que serán incubados a 36°C por un tiempo máximo de 14 días. Se toma también una segunda muestra para prueba de Titulación de Toxina por método Dosis Letal 50 en ratones (DL50%).

Inmediatamente después de tomadas estas muestras se comienza la inactivación del cultivo por adición de 0.8% v/v de una solución de formaldehído 37%, y se incuba a 36°C por 3 días con agitación suave. Finalizados los días de inactivación, se toma una muestra de forma aséptica para confirmar que la inactivación es completa, muestra de *Fin de Inactivación*, sobre la que se realiza la prueba denominada *Control de Fin de Inactivación*, donde se inoculan 5 mL de muestra en 200 mL de medio *Moedema 13* con carne, y se incuba a 36°C, para confirmar que no se puede recuperar el microorganismo cultivado en medio de producción; y una segunda prueba en modelo *in vivo* en ratones, conocida como *Prueba de Detoxificación*, donde 2 ratones son inoculados vía subcutánea con 0.5 mL de muestra y observados durante 7 días. El cultivo se confirma correctamente inactivado si no se observa crecimiento en medio *Moedema 13* luego de 14 días de incubación, y si no se registra ni muerte ni anomalías en los animales inoculados durante los 7 días.

El antígeno continúa con el procesamiento conocido como *Down-stream*, donde es enfriado a 5°C y luego es separada la masa bacteriana por centrifugación. El antígeno es procesado luego por ultrafiltración con poro de 10 KDa, donde es lavado haciendo agregados de agua calidad inyectables (WFI = *Water For Injection*) estéril sobre el concentrado, el permeado de la ultrafiltración es descartado y lo retenido es nuevamente concentrado a un nivel 10x. Por último, se realiza una

filtración clarificante del concentrado con poro de 0.65 micras. Una vez concentrado y clarificado el antígeno es envasado asépticamente en envases plásticos de 25 Litros de capacidad. Se extrae una muestra para determinar el contenido antigénico final mediante *Test de ELISA* y control de esterilidad por siembra en *Fluido de Tioglicolato* y caldo *Soja Trypticase*.

1.4. Métodos clásicos de detección y cuantificación

1.4.1. Titulación por Dosis Letal 50%

Para *C. novyi* tipo B la virulencia de la toxina al fin de cada cultivo es determinada por titulación en ratones, lo que se conoce como *Titulación por DL50%*. Este resultado se considera como un indicador del rendimiento de cada cultivo.

Titular es determinar la concentración de un “factor” que tiene un posible “efecto biológico” sobre un determinado “indicador biológico”. El “factor”, está contenido en una suspensión o solución, lo que permite mediante diluciones crecientes, evaluarlo a diferentes niveles de concentración. En este caso, el “factor”, son las toxinas en solución de una especie patógena para los ratones, quienes son el “indicador biológico”. El “efecto biológico” buscado es la muerte de los animales.

El ensayo pretende determinar la concentración de toxina que mata el 50% de los animales sobre los que se aplica una determinada solución de la muestra, a este valor se le conoce como Dosis Letal 50, y tradicionalmente se escribe como DL50%.

El resultado de la prueba se puede expresar como un *título* (DL50%), lo que se entiende como el factor de dilución que genera la muerte del 50% de los animales. O en función de DL50%/mL, donde se expresa cuantas Dosis Letales 50 tiene el material original por mL. En este caso, al trabajar con factores de base 10, se puede expresar como el exponente de 10 correspondiente a la dilución que mate el 50% de los animales. Por lo tanto, la dilución que corresponde al título contiene 1 DL50% en el volumen inoculado.

Para minimizar el uso de animales sin dejar de cubrir posibles variaciones en la prueba, se usa el modelo matemático publicado por L. J. Reed y H. Muench en 1938⁵, el cual actualmente se conoce como Método Reed-Muench, donde se registra el punto de corte como el valor que queda comprendido entre dos diluciones críticas.

El método se basa en dos suposiciones:

- Un animal muerto a una dilución dada habría muerto también a diluciones menores.
- Un animal que sobrevivió a una dilución dada habría sobrevivido también a diluciones mayores.

A modo ilustrativo se describen los resultados de una titulación hipotética:

Supongamos que se inoculan 6 ratones por dilución, y recordemos que el efecto buscado es la muerte de los ratones.

Se confecciona la siguiente tabla con los resultados:

Dilución	$\log_{10}\text{dil}$	Muertos/ Total	Muertos	Vivos	Total de muertos	Total de vivos	Relación	% Mortalidad
1:10	-1	6/6	6	0	17	0	17/17	100
1:100	-2	6/6	6	0	11	0	11/11	100
1:1000	-3	4/6	4	2	5	2	5/7	71
1:10000	-4	1/6	1	5	1	7	1/8	13
1:100000	-5	0/6	0	6	0	13	0/13	0

Para obtener las columnas “Total de muertos” y “Total de vivos”, se suman las cifras del acumulado de “Muertos” y del acumulado de “Vivos”, teniendo en cuenta las suposiciones de que las concentraciones mayores de toxina, por ejemplo la dilución 1:10, hubiese ejercido su efecto sobre todos los ratones inoculados con las diluciones menores; del mismo modo, las concentraciones menores de toxina (dilución 1:100000), nunca hubiesen hecho efecto sobre los ratones inoculados con las concentraciones mayores.

En el ejemplo, de forma intencional, no se observa ninguna dilución (o $\log_{10}$ dilución) tal que el efecto sea exactamente el 50% de Mortalidad, pero vemos que esa dilución estará entre -3 (71% de efecto) y -4 (13% de efecto). Es importante recordar que el “50% de efecto” significa que el efecto se ejerce sobre el 50% de las unidades de “indicador biológico”, en este caso los ratones, y que la DL50% es aquella que mata el 50% de los mismos.

Para establecer este valor se recurre a una interpolación matemática:

En la Figura 1 se representa el % de Efecto acumulativo (Mortalidad) para cada $\log_{10}$ de dilución.

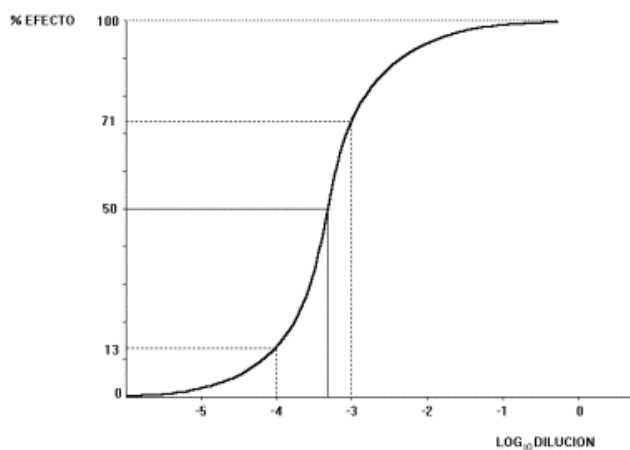


Fig. 1: % Efecto (Mortalidad) vs. $-\log_{10}$ dilución.

Nos interesa averiguar el valor “X”, que corresponde al $\log_{10}$ de la dilución correspondiente a la DL50%. Esto se hace mediante una fórmula que puede deducirse trabajando con los triángulos semejantes de la Figura 2.

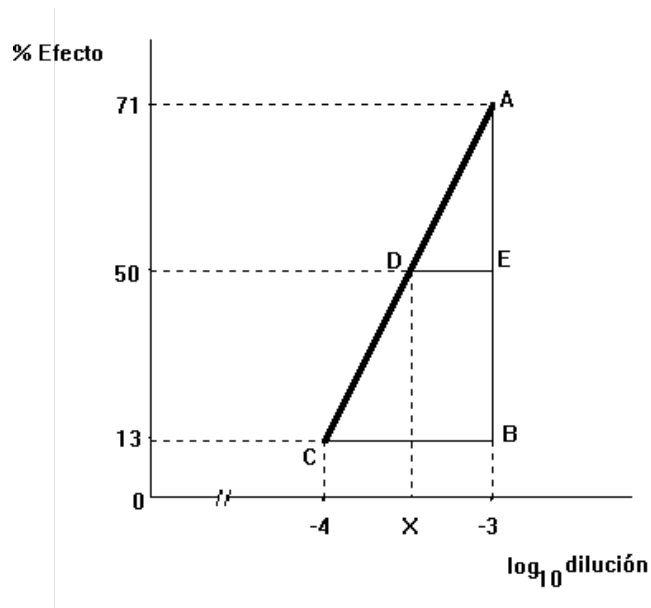


Fig. 2 Triángulos semejantes para el estudio del efecto en función de $\log_{10}$ de la dilución

Los triángulos ABC y AED son semejantes, por lo que sus lados homólogos son proporcionales.

Es decir:

$$(AB/BC) = (AE/ED)$$

$$AB = 71 - 13 \quad BC = -3 - (-4)$$

$$AE = 71 - 50 \quad ED = -3 - X$$

Reemplazando: $(71 - 13) / (-3 - (-4)) = (71 - 50) / (-3 - X)$

El valor de "X" se obtiene por trasposición de términos: $X = -3.36$

Observación: El factor $[-3 - (-4)] = 1$, es constante para todos los casos en que se usan diluciones al décimo. Corresponde al $\log_{10}$ del factor de dilución.

Generalizando:

$$-X = \left[\frac{[(\% \text{Efecto} > 50) - 50\%]}{[(\% \text{Efecto} > 50) - (\% \text{Efecto} < 50\%)]} \right] + \log_{10}(\text{dilución que da } > 50\%)$$

Resolviendo resulta: $\log_{10} \text{DL50\%} = X = -3,36$

Esto significa que en una dilución 1: $10^{3,36}$ del material original hay 1 DL50%.

Por lo tanto, en el material original, sin diluir, hay $10^{3,36}$ DL50%, que se expresan por unidad de volumen de la muestra inoculada por ratón.

El título de toxina de la muestra será: $10^{3,36}$ DL50%, o lo que es igual, 2290,87 DL50%, recordando que es por volumen de muestra inoculada. Este resultado lo expresamos usualmente como “*título* = 3,36”.

Para expresar cuantas Dosis Letales 50 tiene el material original lo expresamos por mL, por lo tanto, como el volumen inoculado por ratón es de 0,5 mL, en el ejemplo serían 4581,74 DL50%/mL.

En nuestro caso para obtener las muestras a inocular de forma aséptica se prepara una dilución inicial de muestra de fin de cultivo con diluyente: 1,0 mL de fin de cultivo se agrega sobre 9,0 mL de diluyente, lo que corresponde a la dilución 10^{-1} , se continua con diluciones sucesivas tomando 1,0 mL de la dilución anterior y agregando 9,0 mL de diluyente, lo que representa en este caso la dilución 10^{-2} , y así hasta la dilución 10^{-5} . Estos niveles de dilución se seleccionaron basados en el histórico de ensayos realizados, donde *C. novyi* B reporta valores entre 3.5 y 4.5 (DL50%). Como diluyente se utiliza una solución de Bactopeptona estéril.

Para cada dilución se inoculan 0,5 mL por vía intraperitoneal a 8 animales y se observan por tres días. Se reporta diariamente animales vivos/muertos y se realiza el modelo matemático con los resultados del último día de observación.

La titulación de toxina por métodos *in vivo* tiene grandes desventajas, no sólo desde el punto de vista ético por el uso de animales de laboratorio, sino que además por el costo asociado a la necesidad de infraestructura para la cría y experimentación. Sumado a esto, existe mucha variabilidad asociada al uso de animales (independientemente de que se trate de cepas endogámicas)⁶. Considerando lo anterior, para evaluar la potencia de antígenos clostridiales, particularmente en *C. novyi* tipo B, es necesario obtener un modelo más robusto, costo-efectivo y que idealmente cumpla con ser un modelo *in vitro*, dentro de esta categoría encontramos los inmunoensayos.

1.4.2. Test de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay)

Luego de la inactivación y de los procesos *down-stream* de concentración y semi-purificación, del toxoide, se mide el contenido antigénico por medio de la técnica *in vitro* ELISA⁷.

La técnica se basa en un principio de interacción entre el antígeno y su anticuerpo específico, y mediante la utilización de un conjugado de enzima, junto con un sustrato que detecte este último, se genera un cambio de color medible por espectrofotometría. El método de ELISA es en sí un inmunoensayo heterogéneo, el cual fue desarrollado en 1971 por los investigadores Engvall y Perlmann⁸, y desde entonces ha ido evolucionando, lo que permite hoy en día contar con distintos diseños de técnicas de ELISAS según la aplicación y el tipo de muestras.

En 2004, se puso a punto en conjunto con el Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene y Prondil S.A. un ELISA del tipo *competencia* para la detección y cuantificación de toxoides de *C. novyi* Tipo B.

Este ELISA de *competencia* implica que, sobre una muestra de toxoide estándar conocida inmovilizada sobre la fase sólida, se agregará una solución previamente preparada mezcla de

Toxoide-problema/Antitoxina. Una vez enfrentados ambos reactivos (toxoides estándar con solución Toxoide-problema/Antitoxina) se generará una reacción de tipo competencia por la antitoxina libre.

Soluciones:

- Buffer Fوسفات Salino (PBS) 1x:
 - Cloruro de sodio (NaCl) (CAS 7647-14-5) 8,0 g
 - Dihidrato dibásico de fوسفات de sodio (Na₂HPO₄) (CAS 10028-24-7) 1,13 g
 - Fوسفات de potasio monobásico (KH₂PO₄) (CAS 7778-77-0) 0,2 g
 - Cloruro de potasio (KCl) (CAS 7447-40-7) 0,2 g
- PBS Tween 0.05%:
 - PBS 1x 1,0 L
 - Tween 20 (CAS 9005-64-5) 0,5 mL
- PBS Tween – BSA 1%:
 - PBS Tween 0.05% 100,0 mL
 - Seroalbúmina Bovina, fracción V, pH 7.0 (Merck cod. 126593) 1,0 g
- Solución OPD:
 - Solución 0.1M Ácido Cítrico (CAS 5949-29-1) 12.5 mL
 - Solución 0.2M Na₂HPO₄ (CAS 10028-24-7) 12.5 mL
 - WFI 25.0 mL
 - OPD (o-phenylenediamine) (Sigma cod. P-5412) 20.0 mg (1 tableta)

Brevemente, microplacas de 96 pozos de poliestireno (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates, Thermo Scientific™ Catalog number: 439454) son usadas como fase sólida, ya que permiten la adsorción de muestras de antígeno, lo que se conoce como etapa de *Sensibilización* de la placa. La muestra utilizada para la sensibilización es un lote interno de toxoide de *C. novyi* Tipo B, el cual fue seleccionado luego de un proceso de validación de muestras. La etapa de sensibilización es un proceso que requiere incubación a 4°C durante al menos 12 horas. Transcurrido este tiempo, las placas son lavadas tres veces con solución PBS Tween 0.05%, con estos lavados retiramos toda solución de antígeno que no haya quedado adsorbida en la superficie. Es importante ocupar con moléculas irrelevantes para el ensayo los sitios de la superficie que no hayan sido ocupados por antígeno, a este paso se le conoce como *Bloqueo*, se debe incubar las placas a temperatura ambiente por 50 minutos utilizando una solución PBS Tween-BSA 1%. La BSA es albumina de suero bovino, y al ser una proteína irrelevante para los sistemas antígeno-anticuerpo involucrados en el ensayo, no causara interferencias durante la reacción. Las placas bloqueadas pueden ser congeladas durante 2 meses o utilizadas inmediatamente.

Las muestras problema, o muestras a analizar, como ya mencionamos, son los toxoides obtenidos luego del proceso *down-stream*, éstas deben ser acondicionadas previamente en diluciones seriadas usando como diluyente PBS Tween-BSA 1%, se trabaja con diluciones de (½) a (½)¹⁹. El mismo tratamiento se debe hacer sobre la muestra estándar, el cual es una muestra de toxoide de un lote interno seleccionado luego de un proceso de validación. Esta muestra estándar es usada para validar la placa.

Continuando con el proceso de acondicionamiento de las muestras a analizar, sobre cada dilución previamente preparada se debe agregar una solución de antitoxina y se incuba a temperatura ambiente durante 50 minutos para permitir que se dé la reacción antígeno/antitoxina. Una vez transcurrido este tiempo, lo que queda en solución es una cantidad determinada de antitoxina libre,

la cual será capaz de reaccionar con el toxoide estándar adsorbido sobre la placa durante el paso de sensibilización. Durante este tiempo, se debe preparar la curva de calibración, donde contaremos solo con muestra de antitoxina en diluciones seriadas, el diluyente utilizado es el mismo que para las muestras a analizar, PBS Tween-BSA 1%.

Para poder realizar la siembra de las muestras a analizar sobre las placas previamente sensibilizadas y bloqueadas, es necesario realizar primero tres lavados con solución PBS Tween 0.05% para retirar todos los excesos de BSA que no fueron adsorbidos en los pozos. La siembra se realiza agregando 50 uL de muestra de competencia por pozo y luego la curva de calibración se agrega por duplicado, a su vez, se utiliza una línea de pozos para el blanco, donde se agregará 50 uL de PBS Tween-BSA 1%. Las placas luego deben ser incubadas por 50 minutos a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de siembra, se hacen 4 lavados con PBS Tween 0.05% y se agrega a cada pozo 50 uL de una solución de *conjugado rabbit-antigoat IgG HRP (SIGMA AP106P)*⁹, y se incuba a temperatura ambiente por 50 minutos. Esta solución se prepara diluyendo 1/750 el reactivo en PBS Tween-BSA 1%. El reactivo *conjugado rabbit-antigoat IgG-HRP* (Horseradish Peroxidase) está formado con un anticuerpo secundario, de inmunización en cabra (*antigoat*), unido covalentemente a HRP. HRP es una enzima de generación natural en la planta del rábano (*Armoracia rusticana*) y los anticuerpos secundarios son conjugados con ésta para aumentar la sensibilidad de la técnica (o disminuir su límite de detección) amplificando su señal. Como sustrato de la enzima HRP, se usa un compuesto incoloro, el reactivo *o-phenylenediamine (OPD)*. La reacción se lleva a cabo porque el H₂O₂ actúa en primer lugar como oxidante para la enzima HRP, donde se da comienzo a la catálisis del OPD, el cual también es oxidado en el sitio activo de la enzima, a su vez H₂O₂ actúa como oxidante para los intermediarios de reacción, donde no participa la enzima HRP. Como producto principal se obtiene 2,3-diaminophenazine (DAP), el cual es coloreado y permite que la reacción global sea medida con un espectrofotómetro a 490 nm¹⁰.

1.5. Antecedentes del problema planteado

Desde el año 2017, en la planta, se comenzó a registrar una tendencia a la baja en la producción de toxina de *C. novyi* Tipo B (Figura 3), y consecuentemente del toxoide derivado (Figura 4), lo que ha obligado a aumentar la concentración del antígeno (*input* antigénico) en las vacunas (Figura 5). Sin embargo, esta acción no mejoró el desempeño de las vacunas finales, los resultados de pruebas de potencia indican una baja calidad y cantidad del antígeno producido (Figura 6).

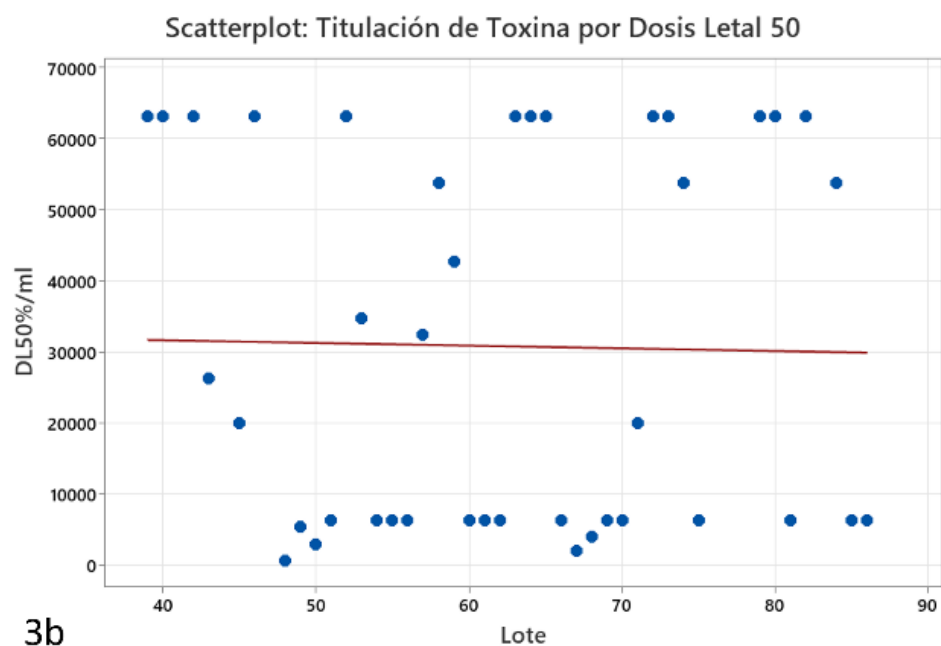
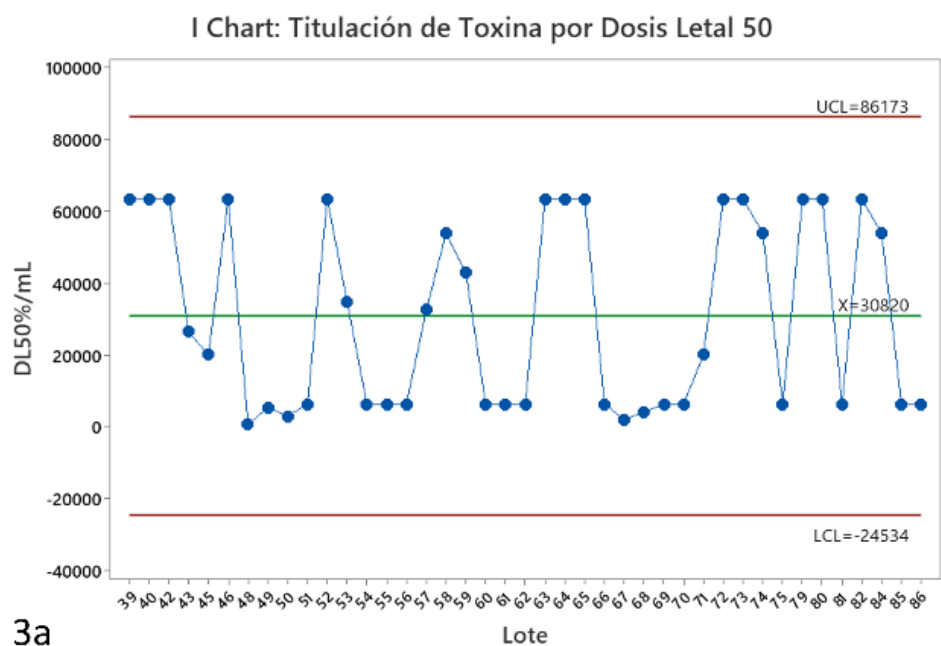
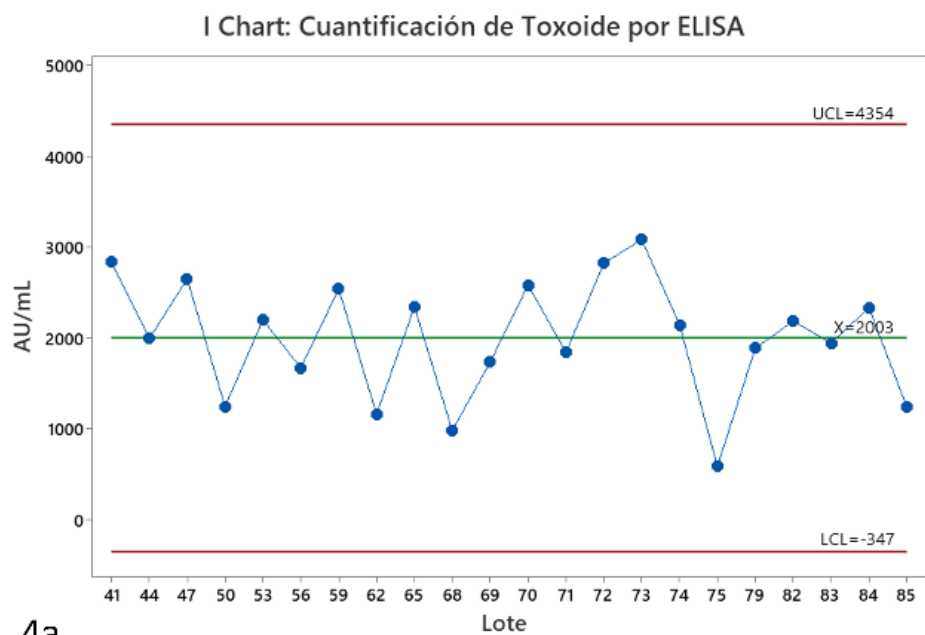
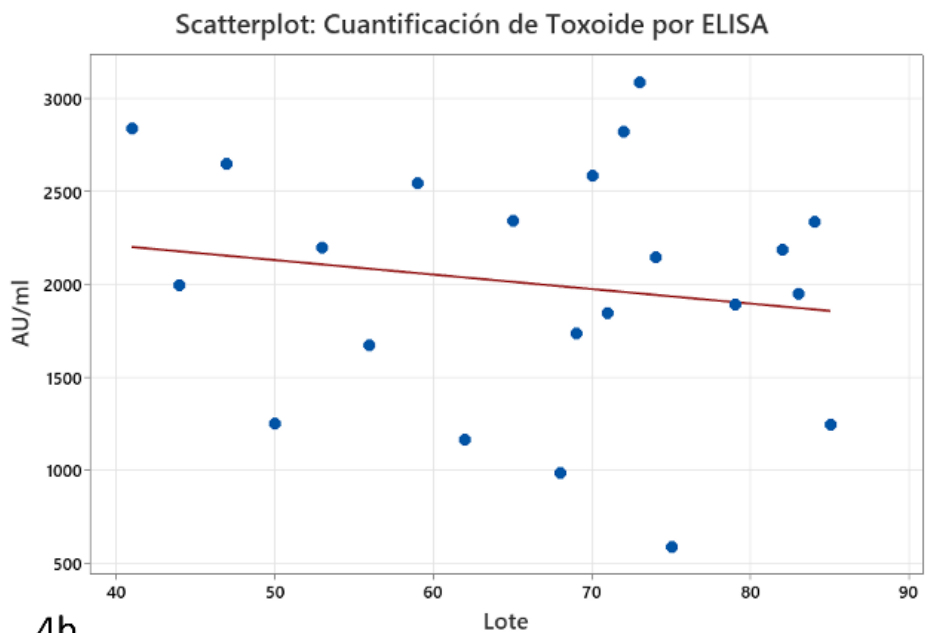


Fig. 3. Evolución del histórico de resultados de producción de toxina evaluado mediante Dosis Letal 50. En los gráficos de control (I Chart), imagen 3a, se observan los límites de tolerancia y la media del histórico de rendimientos de producción de toxina, expresado como LD50%/mL en función del número de lote producido. Mediante grafica de Scatterplot, imagen 3b, se examina la relación entre la cuantificación de toxina (eje y) y los sucesivos lotes producidos (eje x), se observa una leve tendencia a la baja en los rendimientos.



4a



4b

Fig. 4. Evolución del histórico de resultados de contenido antigénico evaluado mediante Test de ELISA. En la imagen 4a se observan mediante gráfica de control (I Chart) los límites de tolerancia y la media de rendimiento de toxoide, expresado como AU/mL según los lotes industriales. En la imagen 4b, la gráfica Scatterplot registra nuevamente la tendencia a la baja en los sucesivos lotes producidos, la cual en contenido antigénico se hace mucho más evidente.

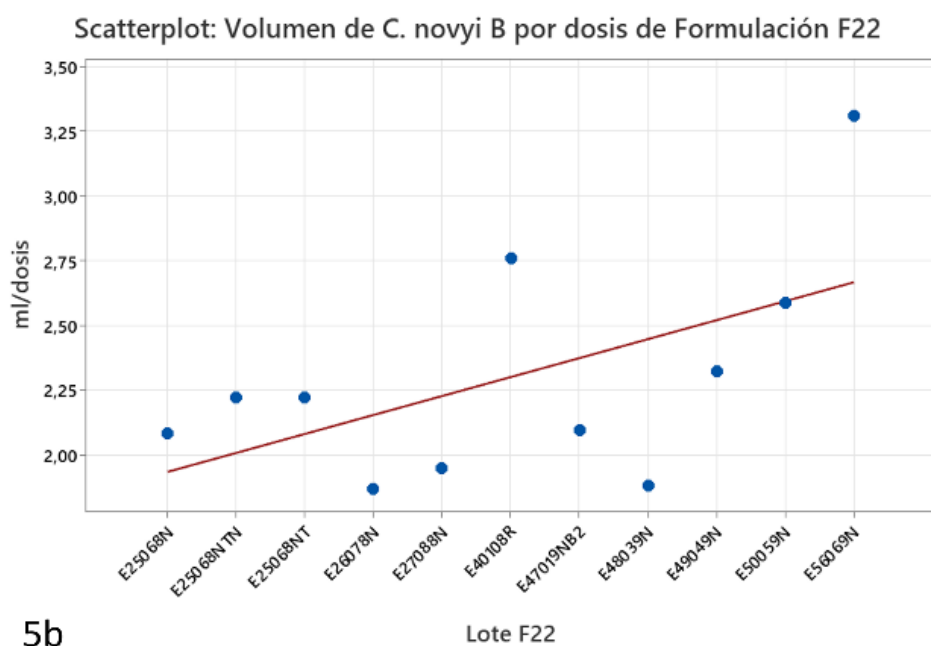
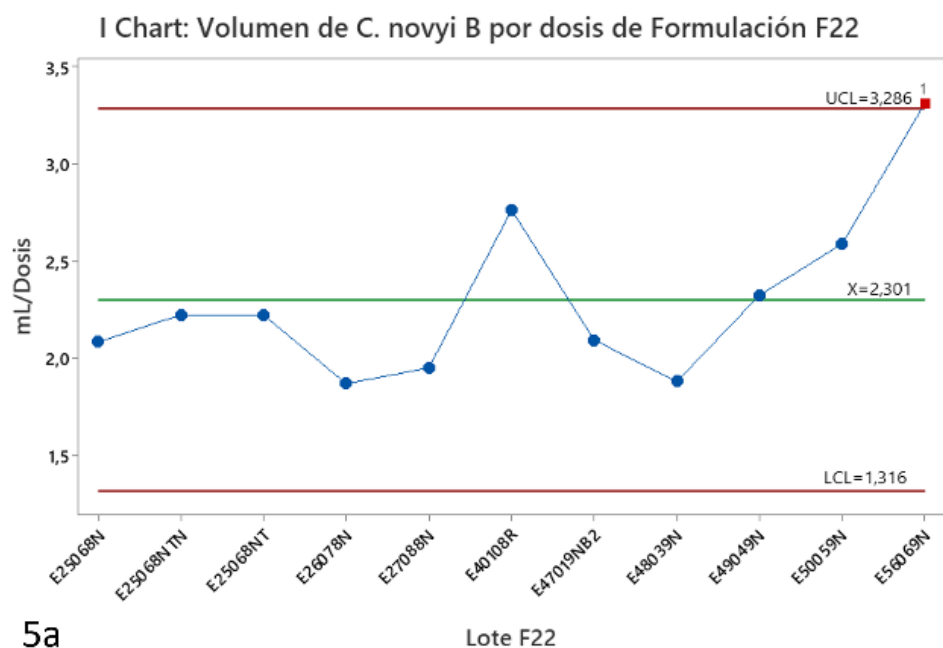


Fig. 5. Histórico de *input* antigénico en vacunas experimentales poli clostridiales (de ahora en más llamada Formulación F22) evaluadas contra *C. novyi* tipo B. En la imagen 5a se observa mediante gráfica control (I Chart) la media de 2,301 mL de antígeno por dosis. En la imagen 5b la gráfica Scatterplot adjunta registra la tendencia a agregar cada vez más mL de antígeno por dosis a la formulación.

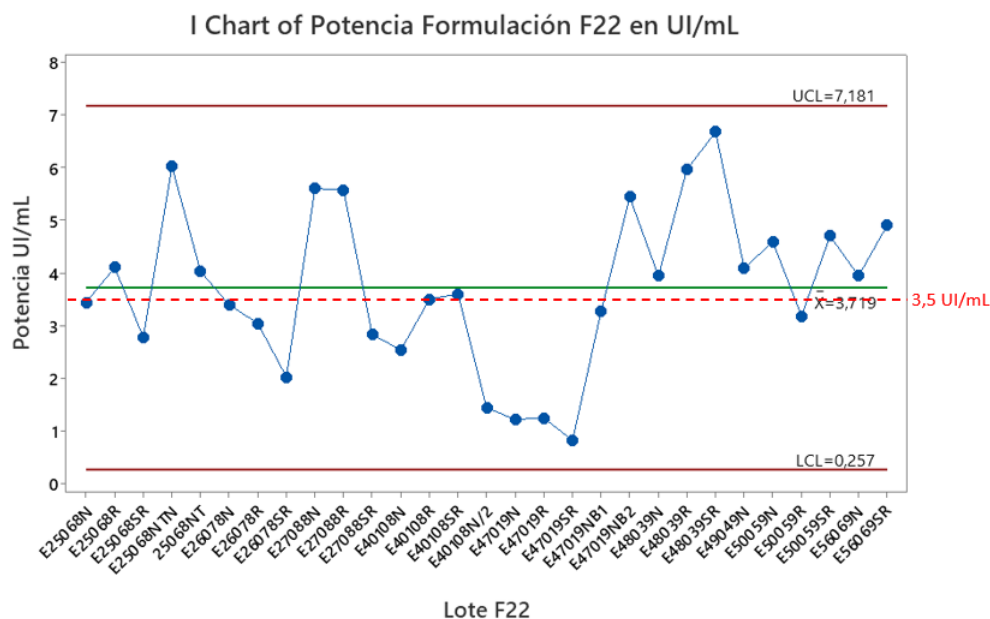


Fig. 6. Histórico de pruebas de potencia de vacunas experimentales poli clostridiales evaluadas contra *C. novyi* tipo B. Se observa que el 41% de los lotes no cumplen con el límite de aprobación de 3,5 UI/mL indicado por Farmacopea Europea.⁷

Evaluando todo el panorama se identifica no solo una baja en los rendimientos del cultivo, si no una producción de toxina/toxoide con propiedades inmunológicas pobres debido a la necesidad de formular vacunas con cada vez más mL/dosis, y aun así se registran formulaciones experimentales que no cumplen con los límites de aprobación. Todos estos parámetros presentados en conjunto evidencian el gran problema en la producción de *C. novyi* Tipo B. Se plantea entonces como objetivos principales revertir esta tendencia a la baja que se observa tanto a nivel de producción de toxina, como en la consecuente producción de toxoide, apuntando a obtener resultados del doble del valor promedio histórico de 30820 DL%/mL. Así como resultados de Test de ELISA no menores a 2130 UA/mL, histórico que hoy registra 2003 UA/mL en promedio. Con esto se espera reducir el porcentaje de rechazo de vacunas experimentales de 41% a menos del 5%, reduciendo también el *input* antigénico en formulaciones a < 2 mL de antígeno por dosis.

2. Objetivos

2.1. Hipótesis

La semilla generada para la inoculación del tanque de producción industrial no está siendo cultivada en las condiciones óptimas de crecimiento, y los tiempos y condiciones de incubación para la fermentación principal presentan puntos débiles en el proceso.

2.2. Objetivos generales

- Mejorar los títulos de toxina duplicando el promedio histórico de 30820 DL%/mL.
- Mejorar el contenido antigénico desde un valor actual de 2003 UA/mL a valores ≥ 2130 UA/mL evaluado por ELISA.
- Reducir el porcentaje de rechazo en vacunas experimentales de 41% a $< 5\%$
- Reducir el volumen de antígeno incluido en cada vacuna (*input* antigénico de formulación) a valores < 2 mL/dosis

2.3. Objetivos específicos

- Conocer en detalle la evolución de crecimiento de semilla.
- Sembrar el tanque industrial con una semilla en fase exponencial de crecimiento.
- Evaluar el impacto de las condiciones de cultivo dentro del tanque industrial.
- Desarrollar una técnica que permita seguir *in situ* la producción de toxina dentro del tanque industrial.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepa de trabajo

La cepa utilizada en producción es conservada por congelación en Nitrógeno líquido a -185°C , lo que permite que se mantenga con sus propiedades antigénicas intactas.

Clostridium novyi tipo B: CN 6120, es una cepa procedente de WELCOME RESEARCH LABORATORY y fue cedida a PRONDIL S.A. en 1992 por COOPERS URUGUAY S.A., como parte de un acuerdo de suministro de cepas.

3.2. Nuevos métodos desarrollados de detección y cuantificación

3.2.1. Inmunodifusión radial (IDR)

En el marco de este trabajo se plantea el desarrollo de la técnica de Inmunodifusión radial (IDR), la cual mediante un modelo *in vitro* de interacción antígeno-anticuerpo permite la cuantificación tanto de toxina como de toxoide¹¹. Mediante IDR es posible evaluar la cinética de producción de toxina tomando muestras sucesivas durante la incubación del clostridio, lo que nos permitirá conocer el comportamiento de la producción de toxina en tanque, y evaluar el momento de máxima producción. Una vez identificado dicho momento, será posible extrapolarlo a los próximos lotes para definir un tiempo máximo de fermentación, lo que podría generar un posible ahorro de tiempo y recursos durante el control del bioproceso.

La inmunodifusión radial (IDR) es una técnica cuantitativa basada en la precipitación en gel de un sistema antígeno-anticuerpo. Para cuantificar el antígeno, se incorpora al gel una cierta cantidad de

anticuerpos específicos, con lo que, al aplicar posteriormente una muestra de antígeno sobre el gel y dejar difundir libremente, se dará la reacción específica. Esta reacción en gel se conoce como inmunoprecipitación¹².

El acondicionamiento del gel consiste en cortar hoyos de un diámetro específico, y sobre esos hoyos es donde se colocará posteriormente la muestra de antígeno. El antígeno al difundir sobre el gel genera la reacción con el anticuerpo y forma un precipitado circular, que denominamos halo de reacción. El diámetro del halo es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra y se expresa en milímetros dado que es cuantificado con un calibre digital¹¹.

En Prondil MSD tenemos experiencia en la técnica porque anteriormente fue desarrollada para la cuantificación de toxoide tetánico. Se planteo en esta oportunidad el desarrollo para poder hacer un seguimiento de la cinética de producción de toxina en tanque.

Pero en primera instancia necesitábamos corroborar que la técnica funcionara para la antitoxina y toxina disponibles en sitio, así como determinar la concentración de antitoxina necesaria por mL de gel. Basados en la experiencia con *C. tetani* donde se utilizan 5 UI de antitoxina por mL de gel, preliminarmente se sombró un gel con el anticuerpo usado de rutina en control de calidad para pruebas de ELISA a una concentración de 1 UI de antitoxina por mL de gel y pretendiendo evaluar los rendimientos para luego ir incrementando paulatinamente la concentración. Luego sobre el mismo se sembraron muestras de toxoide concentradas (contramuestras de antígenos aprobados) en diluciones seriadas de 1:1 a 1:16 a modo de screening, se observó entonces que la respuesta era buena, dando un buen halo de precipitación definido y medible. Se decide continuar trabajando a razón de esta concentración de antitoxina en gel y se procedió a probar que la toxina producida a nivel industrial también revelara un halo medible. Para esta prueba el screening de diluciones fue entre 1:1 a 1:4, dado que el toxoide está 10 veces concentrado en comparación de la toxina. El resultado también fue satisfactorio a las diluciones de trabajo de 1:1 y 1:2.

A su vez, para poder estandarizar la producción del gel, y validar las sucesivas respuestas, se decide seleccionar una muestra como estándar interno, la cual será incluida en todos los geles. La muestra seleccionada es el toxoide L65049, cada vez que se corre un gel de IDR a modo de screening se siembra este toxoide a la dilución 1:4 y si el resultado del halo de precipitación para esta muestra se mantiene constante con respecto a otros geles consideramos la prueba como válida.

Reactivos:

- Agar noble (CAS 9002-18-0) al 1.4% en suero fisiológico tamponado pH 7.15
- Azida de sodio (Merck) 1% (CAS 26628-22-8)
- Cloruro de sodio (NaCl) (CAS 7647-14-5)
- Dihidrato dibásico de fosfato de sodio (Na₂HPO₄·2H₂O) (CAS 10028-24-7)
- Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (CAS 7778-77-0)
- Coomassie Brilliant Blue R250 (CAS 6104-59-2)
- Etanol 96° (C₂H₅OH) (CAS 64-17-5)
- Ácido acético glacial (C₂H₄O₂) (CAS No. 64-19-7)
- Agua desmineralizada

Materiales:

- Placas de vidrio de 100 X 100 X 1.5 mm
- Marco de plástico de 100 X 100 X 1.5 mm

- Pinzas de papelería para fijar las placas de vidrio
- Matriz de plástico para hacer los agujeros en el agar
- Perforador telescópico de 3 mm de diámetro
- Cámara húmeda donde incubar la placa de agarosa
- Papel de filtro Whatman® N°1, 3 o similar.

Soluciones:

- Suero fisiológico tamponado pH 7.15
 - Cloruro de sodio (NaCl) (CAS 7647-14-5) 8,12 g
 - Dihidrato dibásico de fosfato de sodio (Na₂HPO₄·2H₂O) (CAS 10028-24-7) 0.994 g
 - Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (CAS 7778-77-0) 0,48 g
- Solución de enjuague (solución de cloruro de sodio 0.1 M)
- Solución colorante (Azul de Coomassie):
 - Coomassie brilliant blue R250 (CAS 6104-59-2) 5.0 g
 - Etanol a 96° (CAS 64-17-5) 450 mL
 - Ácido acético glacial (CAS 64-19-7) 100 mL
 - Agua desmineralizada 450 mL
- Solución decolorante:
 - Etanol a 96° 450 mL
 - Ácido acético glacial 100 mL
 - Agua desmineralizada 450 mL

Muestras:

- Antígeno de referencia: Toxoide L65049 10x
- Anticuerpo de referencia: NIBSC WHO 1100 UI Liof¹³
 - Stock: 100 UI/mL
 - Solución de trabajo: 1 UI/mL
- Toxina problema

Procedimiento:

La preparación de la suspensión de agar noble se realiza a 14 g/L, donde se deben disolver 14 g de agar noble en 1 L de suero fisiológico tamponado a pH 7.15. La mezcla es calentada a baño maría hasta disolución total, e inmediatamente observada la disolución se debe retirar del baño para evitar que la solución se torne con una coloración amarilla. A continuación, se adiciona solución de azida de sodio al 1% y se reparten 12 mL de solución en tubos de vidrio con tapa rosca. Se almacenan los tubos a 4°C hasta por un mes.

Para acondicionar una placa de gel, se hace fundir el contenido de un tubo (12 mL) de agar a baño maría, una vez fundido se deja termostatar en baño de agua a 56°C durante 10 minutos, estabilizada la temperatura se adiciona al tubo la cantidad suficiente de solución de antitoxina diluida en suero fisiológico tamponado a razón de obtener 1 UI/mL de gel. Se homogeniza suavemente evitando la formación de espuma y se vierte la solución fundida de agar sobre un soporte, el cual se forma con dos placas de vidrio más un marco de plástico en forma de U y fijados entre sí por pinzas de papelería. Se deja solidificar a 4°C durante 15 minutos. Una vez obtenida la placa de gel se separan

ambos vidrios dejando que el gel apoye sobre uno de ellos y se procede a realizar los hoyos con el perforador y utilizando una matriz patrón que separa los hoyos entre sí un diámetro apropiado (Figura 7).

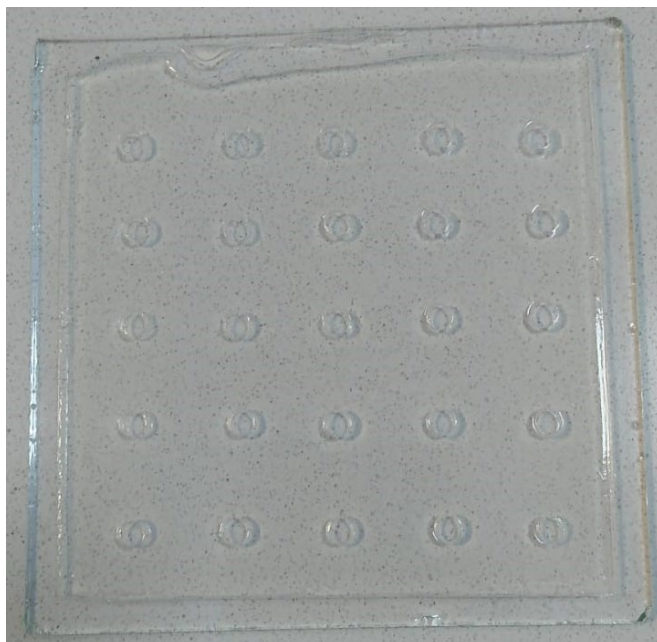


Fig. 7. Se presenta un gel IDR pronto para ser sembrado con las muestras. Se puede ver el gel posicionado sobre el vidrio que lo sostiene y el patrón de los hoyos ya recortados.

Las muestras son luego colocadas dentro de los hoyos, agregando con micropipeta calibrada 10 μ L de muestra en cada pozo. Dado que no se conoce la cantidad de toxina por μ L, a modo de screening se trabaja con diluciones seriadas al medio, preparadas previamente en tubos con solución de suero fisiológico tamponado pH 7.15. Una vez sembrada en los hoyos, la muestra se deja migrar dentro del gel por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se coloca el vidrio conteniendo el gel en una cámara húmeda y se incuba a 37°C por 72 horas.

Cumplidas las 72 horas, el gel es lavado dos veces con solución de enjuague, luego una tercera vez con agua desmineralizada y se secan los excesos de agua con papel Whatman n°3 delicadamente para no romper o marcar el gel. Se debe ahora colorear el gel para evidenciar los halos de precipitación. La coloración se da en dos etapas, en primera instancia se sumerge la placa de vidrio con el gel en solución colorante por 20 minutos, luego se enjuaga con agua para eliminar los restos de colorante que no quedaron adheridos al gel y en segunda instancia se comienza una decoloración suave, usando solución de decoloración y agitación lenta por al menos 30 minutos hasta que se evidencia la aparición de los halos. Por último, el gel es secado a totalidad usando un secador electrónico, el secado es completo cuando se observa cómo queda una suave película de gel adherida al vidrio. Los halos son entonces medidos en diámetro usando un calibre digital. (Figura 8)



Fig. 8. Se presentan dos trozos de gel ya teñidos, donde se puede observar la necesidad de sembrar la muestra problema a diferentes concentraciones a modo de screening. En el primer gel se observa como una dilución al medio en el primero hoyo permite una medición correcta del halo, mientras que, en el segundo gel, recién con una dilución 1:8 se observa un halo correctamente definido para ser medido.

Como se mencionó anteriormente, la aplicación de esta metodología se desarrolló en este trabajo para poder hacer un seguimiento de la producción de toxina tomando muestras del cultivo desde el fermentador industrial, lo que permite conocer a los diferentes tiempos de incubación que cantidad de toxina hay en solución y establecer así una cinética del rendimiento de cada cultivo. Llamamos a esta determinación una cuantificación cualitativa de cada lote, dado que no se está cuantificando contra una muestra patrón de valor definido, si no que, el valor obtenido del diámetro en milímetros de cada halo de precipitación antígeno-anticuerpo permitirá evaluar la evolución de producción de toxina por lote, con el fin de definir un correcto punto de corte para el cultivo principal cuando la producción llega a su máximo potencial.

3.2.2. Cromatografía de inmuoafinidad

Se plantea, como implementación novedosa, poner a punto un ensayo *in vitro* para detección de toxina basado en cromatografía de inmuoafinidad.

La ventaja de la cromatografía de inmuoafinidad con respecto a la inmunodifusión radial, es que los resultados se obtienen luego de 20 minutos de corrida la muestra, mientras que en IDR los resultados son revelados luego de 72 horas de incubación del gel. Esto nos permite no solo conocer la cinética de producción de toxina en el mismo momento en que se está incubando, si no que a medida que se va generando la fermentación nos permite ir estimando *in situ* cual será el momento más apropiado para detener la incubación.

La cromatografía de inmuoafinidad se basa en una reacción antígeno-anticuerpo altamente específica, donde en esta oportunidad se utilizará un anticuerpo monoclonal (mAb) purificado y específico para el antígeno de interés. Éste es inmovilizado a la matriz de una columna de forma que conserve su capacidad de unirse al antígeno haciendo de ligando para las muestras que sean posteriormente corridas por la columna. Por lo tanto, mediante los principios de cromatografía, una muestra pura de cultivo es cargada y corrida a través de la columna, y la fracción de muestra que no se mantenga unida será eluida con los lavados, mientras que la fracción de interés (la toxina ligando de la antitoxina inmovilizada) quedará retenida a la matriz y podrá ser posteriormente eluida únicamente con cambio del pH del buffer (fase móvil), que debilite así la interacción antígeno-anticuerpo. De esta forma es posible identificar y cuantificar el antígeno correspondiente^{14,15}.

3.2.2.1. Anticuerpos monoclonales y Columnas de Cromatografía

Los anticuerpos monoclonales son producidos en la planta de MSD situada en Boxmeer, Holanda por el grupo de trabajo *MonoClonal Antibody (MCA) Team*. Este Departamento brinda soporte a nivel mundial a todos los sectores de Desarrollo y Manufactura de MSD Animal Health, generando hibridomas para proveer de anticuerpos específicos.

Los anticuerpos de alta calidad son generados usando la técnica de electro fusión, beneficioso porque requiere el uso de un número muy pequeño de animales¹⁶. Los serotipos específicos de hibridomas fueron obtenidos con técnicas como la selección de linfocitos B y proliferación de linfocitos B, luego de la fusión, los hibridomas específicos para cada antígeno son seleccionados por técnicas de ELISA, inmunofluorescencia indirecta, o Western Blot. Los hibridomas son clonados repetidas veces para obtener una óptima secreción de anticuerpos.

Detalles del anticuerpo monoclonal utilizado durante este trabajo:

Anticuerpo monoclonal (mAb)	Especificidad	Isotipo	Lote
CNO4-INT	<i>Clostridium novyi</i> - alpha toxin	IgG1	2018-ATS-001-113P

Una vez obtenidos los IgG1, éstos son cargados a las columnas de cromatografía, las cuales son específicas para esta metodología y se conocen comercialmente como HiTrap NHS-activated HP™. Éstas son columnas que ya vienen empacadas con una matriz de Sepharose™ de alto rendimiento activada por NHS (N-hydroxysuccinimide) para el acoplamiento del ligando mediante aminas primarias cerca del pH neutro¹⁷ (Figura 9).

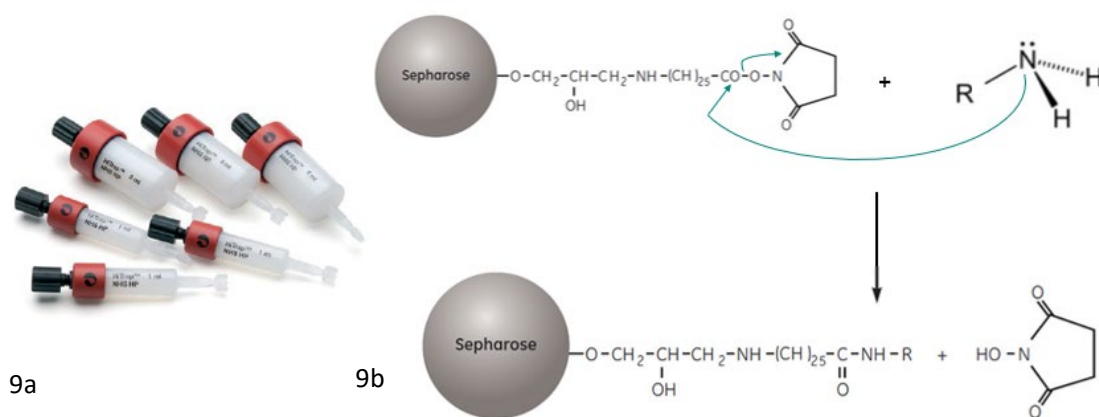


Fig. 9. 9a. Columnas *HiTrap NHS-activated HP™*. 9b. Se presenta la reacción genérica de inmovilización del ligando a la matriz de la columna *HiTrap™*, en nuestro caso un anticuerpo monoclonal específico para *Clostridium novyi* - alpha toxin (IgG1).

En esta oportunidad las columnas de cromatografía fueron donadas por MSD Upper Hutt Animal Health, Sitio Nueva Zelanda, con los anticuerpos monoclonales ya inmovilizados a la matriz, y cuentan con una vida útil de aproximadamente 150 corridas, período otorgado en base a la

experiencia recolectada en el Sitio de Upper Hutt con el correr de los años y parámetro que será evaluado a nivel de nuestro sitio en función de los rendimientos de las columnas con el tiempo. Esta colaboración se da puntualmente en el marco de un proyecto de MSD a nivel global de reemplazo de pruebas que utilizan modelos animales. En concreto, 5 plantas de manufactura para salud animal de distintas partes del mundo participan en conjunto para desarrollar e implementar nuevos modelos *in vitro* para la detección de antígenos clostridiales.

3.2.2.2. Fast protein liquid chromatography (FPLC): Equipo ÄKTA Go™

El equipo adquirido para utilizar en cromatografía de inmunoafinidad es un ÄKTA Go™ de Cytiva (ex General Electric). Trabaja con un sistema de cromatografía que permite purificar y cuantificar usando la tecnología *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)^{18,19}. El equipo está diseñado para operar junto con el software UNICORN™ y como mencionamos anteriormente, columnas de inmunoafinidad Hi-Trap™. (Figura 10).

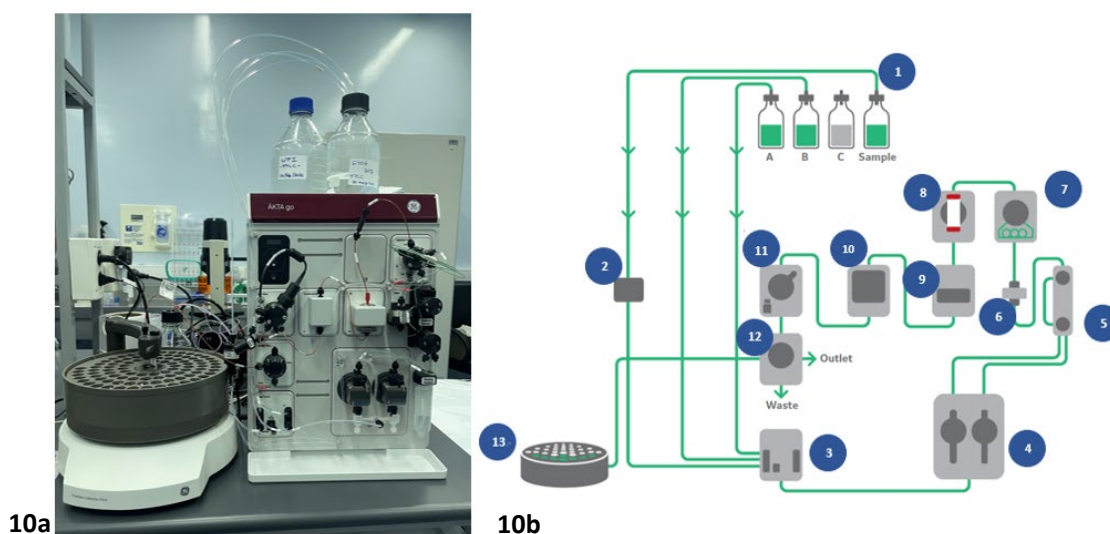


Fig. 10. 10a. Equipo de Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ÄKTA Go™, Departamento Biotechnology Solutions, Laboratorio Prondil MSD, Montevideo, Uruguay. 10b. Diagrama de flujo de los componentes del ÄKTA Go™²⁰.

El equipo tiene un diseño modular con las válvulas, la columna y el detector montado en el frente del sistema, lo que permite una fácil interacción con el mismo. A continuación, se presenta el diagrama de flujo de los componentes del equipo (Figura 10b)²⁰:

- Ítem 1. Sistema de reservorio para 3 distintas soluciones de fase móvil, más una opción para inyección de grandes volúmenes de muestra de forma automática.
- Ítem 2. Sensor de aire para detectar burbujas en la muestra o en la fase móvil.
- Ítem 3. Válvula de entrada para la aplicación y formación de gradientes de fase móvil de forma automática.
- Ítem 4. Sistema de bomba de alta performance que por su diseño prácticamente no generan pulsos que puedan ser luego consecuencia de saltos o ruido dentro del cromatograma. Consta de dos cabezales idénticos, con dos pistones que operan de manera alternada para asegurar un movimiento de fase móvil continuo y con bajas pulsaciones.

- Ítem 5. Monitor de presión que otorga seguridad e integridad a la columna al establecer un límite de tolerancia a la presión.
- Ítem 6. Mezclador estático para homogeneizar fase móvil previo a la entrada a la columna y evitar el efecto de pulsaciones de la bomba a la columna.
- Ítem 7. Válvula de inyección de muestra, se acondicionan diferentes diseños de 'loop' lo que permite inyectar distintos volúmenes de muestra, o simplemente conectar directo a la botella de muestra (Ítem 1) para hacer inyección automática con la bomba para grandes volúmenes.
- Ítem 8. Sector para montar la columna HiTrap NHS-activated HP™.
- Ítem 9. Detector de absorbancia UV a 280 nm, registra información del contenido de proteínas. Las proteínas tienen la propiedad de absorber luz UV a 280 nm.
- Ítem 10. Monitor de conductividad usado para detectar cambios en la concentración de la fase móvil.
- Ítem 11. Detector de pH usado para censar los cambios de pH durante las corridas.
- Ítem 12. Válvula de salida de soluciones, puede estar conectada al descarte o al colector de fracciones.
- Ítem 13. Colector de fracciones, usado durante la purificación para coleccionar los eluidos a diferentes tiempos.

3.2.2.3. Método de Aplicación FPLC:

Reactivos:

- Cloruro de sodio (NaCl) (CAS 7647-14-5)
- Dihidrato dibásico de fosfato de sodio (Na₂HPO₄) (CAS 10028-24-7)
- Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (CAS 7778-77-0)
- Cloruro de potasio (KCl) (CAS 7447-40-7)
- Gly-HCl (C₂H₅NO₂-HCl) (CAS 6000-43-7)
- Agua desmineralizada

Materiales:

- Equipo ÄKTA Go™
- Columnas 1 mL HiTrap NHS-activated HP™, inmovilizadas con mAb *C. novyi* – *alpha toxin*.
- Jeringas 1 mL
- Filtros hidrofílicos 0,45 µm

Soluciones:

- Fase móvil A (Buffer de corrida): 25mM PBS, pH 7.2:
 - PBS 10x 250 mL
 - H₂O 750 mL
- Fase móvil B (Buffer de elución): 0.2M Glycine-HCl, pH 2.2
 - Gly-HCl 11.1 g
 - H₂O 500 mL

Muestras:

- Blanco (establece línea de base): PBS 1x
- Toxina problema

Procedimiento:

La aplicación de esta metodología tiene como fin hacer una detección de la cantidad de toxina presente en cada muestra tomada del tanque industrial, para esto se trabaja con volúmenes de hasta 1 mL de fracción soluble de cada muestra.

Dado que la *toxina alpha* de *C. novyi* Tipo B es una toxina soluble, las muestras a ser corridas en el FPLC deben ser previamente centrifugadas y filtradas por filtros hidrofílicos de 0,45 µm para retener solo la fracción soluble y evitar ensuciar la columna con restos de cultivo y componente celular bacteriano que no aporta a la detección de toxina presente en cada muestra.

El equipo FPLC es armado con un 'loop' de inyección de muestra de 300 µL, el cual debe ser cargado con el doble de volumen para evitar pérdidas e ingreso de aire en la válvula de inyección, esto se hace de forma manual usando una jeringa de 1 mL.

Cada corrida es controlada por el software UNICORN™. Dentro del software se optimizó un programa de corrida de muestra adaptado a las características del 'loop' de inyección seleccionado, la columna y la muestra. El programa divide cada corrida en 4 fases una vez inyectada la muestra en la válvula de entrada. Cada fase está regulada por una serie de comandos que se activan de forma sucesiva y automática una vez iniciada cada corrida.

Comandos de las Fases:

- Fase 1: Aplicación de muestra:
 - Posición de la válvula: *Modo inyección*
 - Flujo de trabajo: 1 mL/min
 - Posición de la válvula: *Modo Carga*
 - Mantener flujo y posición hasta detección UV de 25 mAU
 - Fin de la Fase
- Fase 2: Lavado de columna:
 - Gradiente: Fase móvil A (Buffer de corrida) 100%
 - Flujo de trabajo: 1 mL/min
 - Mantener flujo hasta detección UV de < 1mAU
 - Fin de la Fase
- Fase 3: Elución:
 - Gradiente: Fase móvil B (Buffer de elución) 100%
 - Flujo de trabajo: 1 mL/min
 - Paso 1: Mantener flujo hasta detección UV > 20 mAU
 - Paso 2: Mantener flujo hasta detección UV < 1.5 mAU
 - Fin de la Fase
- Fase 4: Equilibrio de columna:
 - Gradiente: Fase móvil A (Buffer de corrida) 100%
 - Flujo de trabajo: 1 mL/min
 - Mantener flujo hasta pH > 6,50
 - Fin de la Fase

Una vez completadas las 4 fases, el equipo y la columna está en condiciones de correr una nueva muestra. Cada corrida, conteniendo las 4 fases, tiene una duración aproximada de 20 min.

Las columnas HiTrap NHS-activated HP™ de 1 mL tienen restricciones en cuanto a la presión y el flujo de trabajo que soportan, 0.3 MPa y 4 mL/min respectivamente, el proveedor recomienda trabajar con flujos de 1 mL/min.

Luego de cada corrida se registran los resultados evaluando la altura del pico que se evidencia en la fase de elución en el cromatograma. (Figura 11).

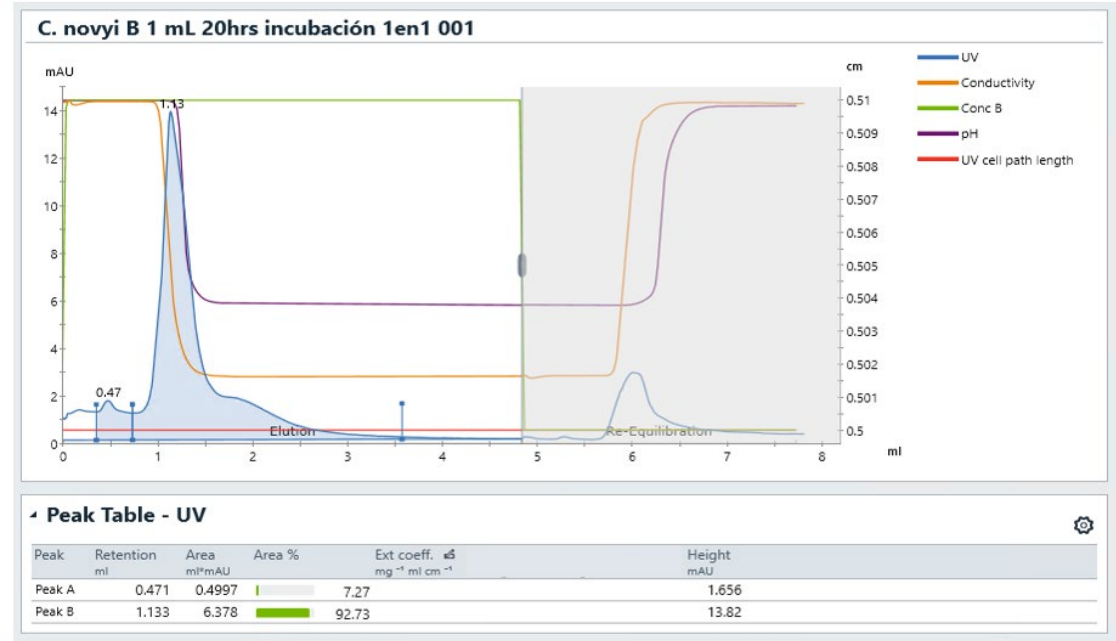


Fig. 11. Ejemplo de cromatograma de una corrida individual con muestra: *C. novyi* Tipo B cultivo con 20 horas de incubación en tanque industrial. Se registra la fase de elución y se evidencia la presencia de un pico de altura 13,82 mAU.

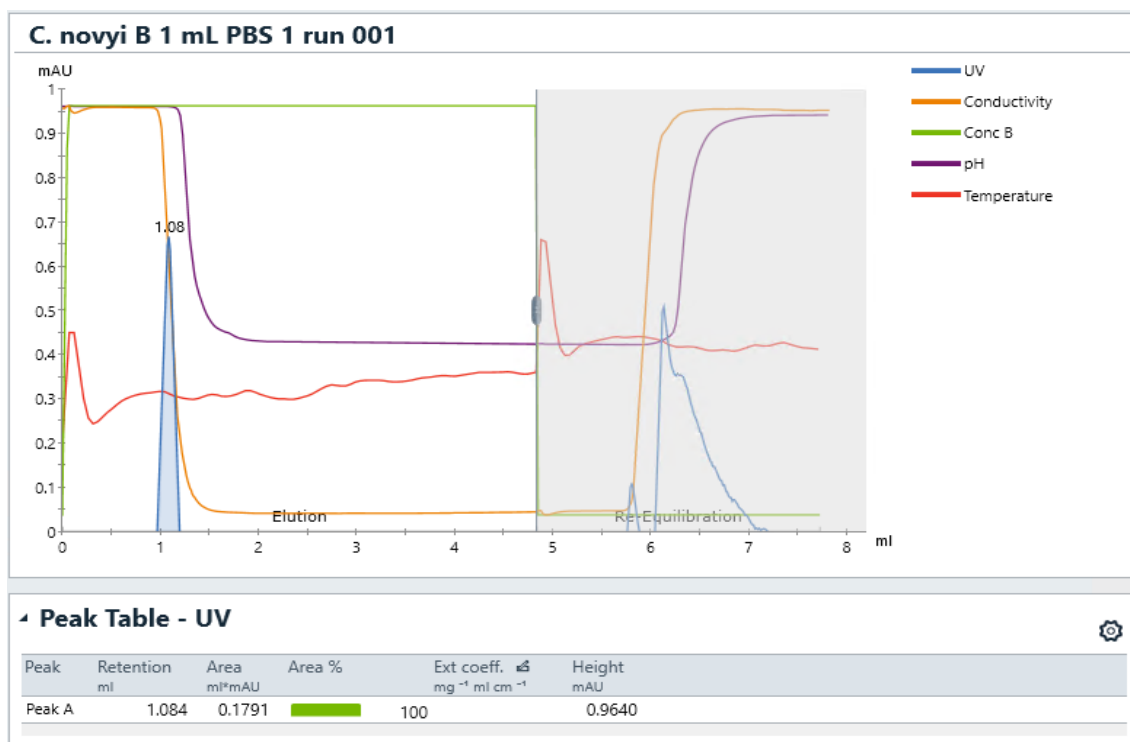


Fig. 12. Ejemplo del mismo conjunto de corridas del ejemplo anterior. Se muestra la fase de elución para el Blanco PBS 1x, donde se marca la altura de línea de base 0,964 mAU, valor contra el cual serán comparadas cada una de las muestras corridas ese día.

Confirmamos que la corrida fue satisfactoria si se evidencia un único pico de altura superior al blanco (PBS 1x) (Figura 12). La unidad de medida de los picos es mAU (mili unidades arbitrarias), en el ejemplo planteado se observa el pico de elución de toxina a una altura 13,82 mAU, mientras que el blanco para la corrida es de 0,964 mAU.

Dado que el interés de esta metodología es evaluar la cinética de producción de toxina para cada lote, podemos hacer un seguimiento del crecimiento del pico a medida que avanza la incubación. Una vez corridas todas las muestras problema y el blanco de trabajo, se acondiciona un cromatograma que unifique todos los picos de elución de las muestras tomadas del lote industrial, donde será posible comparar de una manera cualitativa las alturas de cada pico. (Figura 13).

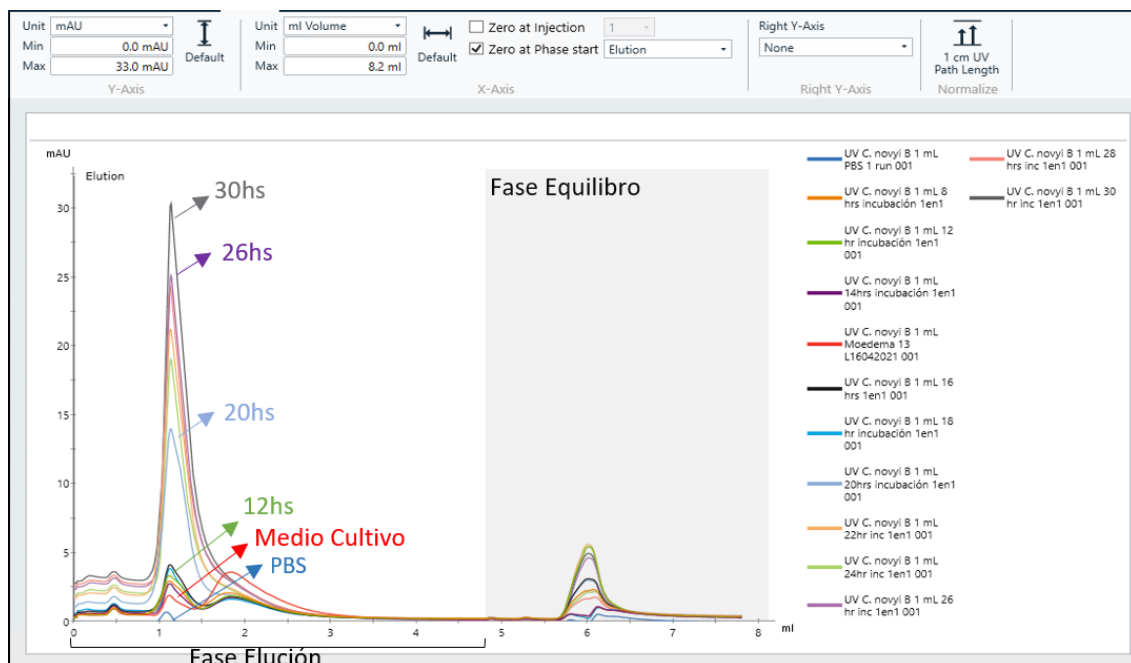


Fig. 13. Ejemplo de cromatograma unificador de todos los picos de elución de las muestras tomadas durante la incubación del Lote de producción industrial L16.

Utilizando el PBS como blanco, se sustrae de cada valor crudo el resultado del pico del PBS y se grafican los datos *FPLC (mAU) Sin Blanco* en función de los tiempos en los que se tomó la muestra del lote. Con este grafico podemos registrar la cinética de producción de toxina y estudiar su evolución. (Figura 14).

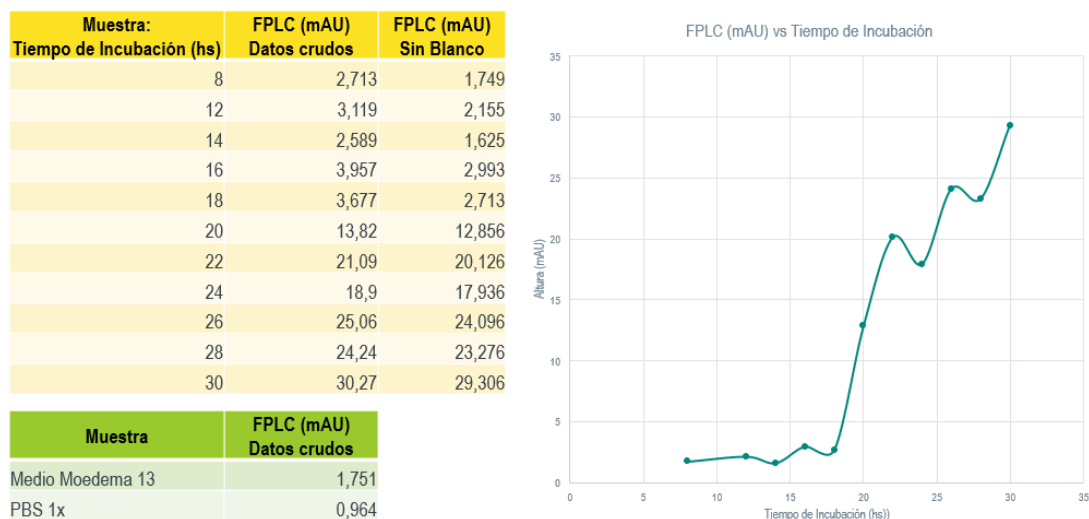


Fig. 14. Tratamiento de datos obtenidos mediante FPLC. Muestras de cinética de producción de toxina tomadas a diferentes horas de incubación durante la fermentación en tanque industrial, L16.

Cabe destacar que previo a el desarrollo de la identificación de toxina se trabajó sobre la identificación de los límites de detección y el rango lineal. El proveedor indica que los límites de detección son 0 – 2000 mAu con Linealidad de +- 5%. Pero se deseaba establecer de manera empírica

estos valores por lo que se hizo un estudio de LOD (mAU) y LOQ (mAU) usando un toxoide estándar importado desde de Upper Hutt. Se entiende por LOD el límite de detección, y por LOQ el límite de cuantificación, y corresponden a los valores mínimos definidos experimentalmente, en mAU, en los que la muestra puede ser detectada y cuantificada confiablemente.

Los resultados fueron:

- o LOD (mAU) 0,89
- o LOQ (mAU) 2,98
- o Rango lineal (mAU) 2.98 – 42

Este rango lineal es óptimo para nuestros niveles de producción de toxina, dado que no se han registrado respuestas más altas de 30 mAU.

4. Discusión y Resultados

Con el fin de identificar determinantes claves durante el cultivo y cuantificación de toxina y toxoide de *C. novyi* tipo B, para así mejorar cualitativamente y cuantitativamente la producción antigénica, se comenzó un estudio del histórico de protocolos de producciones industriales para dicho antígeno y se observó que una etapa crítica como es la producción de semilla no contaba con un seguimiento adecuado de cada repique de expansión durante su período de incubación, ni con una definición concreta para identificar y marcar el fin de incubación de cada etapa de repique.

Tradicionalmente, las fermentaciones se inician por inoculación de semillas cultivadas durante la noche, lo que se conoce en inglés como cultivos “overnight”, solamente teniendo en cuenta el volumen de inóculo en función del volumen total del medio principal, pero esta concepción no considera la densidad celular del inóculo y mucho menos las condiciones fisiológicas del mismo. Estas semillas que funcionan como inóculos, tendrán entonces una composición heterogénea de células, donde habrá una subpoblación en etapa activa de crecimiento, mientras que otras estarán en etapa de esporulación, esto impacta negativamente en el nuevo cultivo, el cual enfrentará un enlentecimiento en el crecimiento e incluso no logrará obtener los máximos niveles de crecimiento posibles.

Considerando todo esto, es necesario estudiar los tiempos de incubación del tren de semilla, intentando obtener un punto de corte con una semilla vigorosa y homogénea, idealmente en fase exponencial de crecimiento, lo que llevará a cultivos reproducibles y consistentes con los máximos rangos de crecimiento posibles para el clostridio en cuestión, característica de suma importancia sobre todo para el último pasaje, R3, inóculo del cultivo principal. Una vez que un medio es inoculado con la semilla, las células necesitan de un tiempo para adaptarse al nuevo medio, donde se optimiza la expresión de genes para sintetizar los nuevos bloques usados para la división celular, esta etapa se conoce como Fase de Latencia (*Lag Phase* en inglés). El crecimiento celular en la fase de latencia es muy lento, por lo que inocular un cultivo nuevo con una semilla en esta fase de latencia genera demoras en alcanzar una fase normal o exponencial de crecimiento, lo que envejece el cultivo y no permite obtener los mejores rendimientos de toxina consecuente²¹.

A su vez, se observó que, a nivel del fermentador principal, se cuenta con poca información de seguimiento del cultivo, también encontrando un lugar a mejora en el hecho de definir un punto concreto de fin de cultivo, y no basado únicamente en el histórico de horas de producción, buscando detener el cultivo en el punto de máxima producción de toxina.

Teniendo todo esto en cuenta, es que se plantea monitorear la evolución de la semilla, sobre todo del último repique, pasaje *R3*, con el fin de obtener un inoculo para el fermentador en fase exponencial de crecimiento. Así como, optimizar las condiciones de incubación en tanque y monitorear el cultivo industrial apuntando a determinar la cinética de producción de toxina para definir un concreto punto de fin de incubación del cultivo principal.

Estudio de los pasajes de semilla:

En la Figura 15 se observa el diagrama tradicional de pasajes desde la expansión de la semilla hasta la siembra del tanque fermentador.

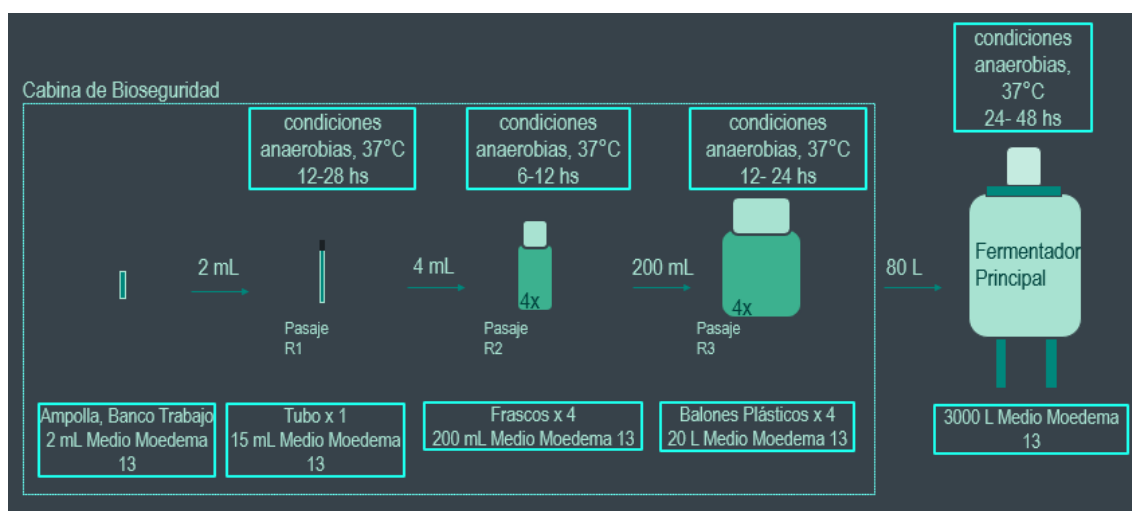


Fig. 15 Diagrama de expansión de semilla hasta siembra de cultivo principal.

Los pasajes *R1* y *R2*, al ser incubados en recipientes de vidrio permiten observar turbidez del medio, y a su vez, gracias a que es un medio nutrido con carne, la generación de gas durante la fermentación hace que la carne suba a la superficie del medio. Estas dos características se utilizaban como indicador de crecimiento, y marcaban el fin de incubación de cada etapa, pero no se conocía exactamente en qué fase de crecimiento se encontraba el cultivo, o que condiciones heterogéneas estaba la población celular de la semilla²¹.

Para conocer la evolución de la semilla dentro de cada repique, se tomaron muestras a diferentes tiempos dentro de los definidos en el procedimiento y se evaluó mediante microscopía por técnica de Gram el nivel de producción de bacilos y el estado de división celular. Descubriendo que, si se esperaba hasta la elevación de la carne, la semilla ya entraba en un estado de latencia, lo que demoraba la expansión del siguiente pasaje.

Se define entonces determinar el fin de incubación para los pasajes *R1* y *R2*, al momento en que se observe leve turbidez y presencia de gas (burbujas de aire) dentro de la carne (Figura 16).

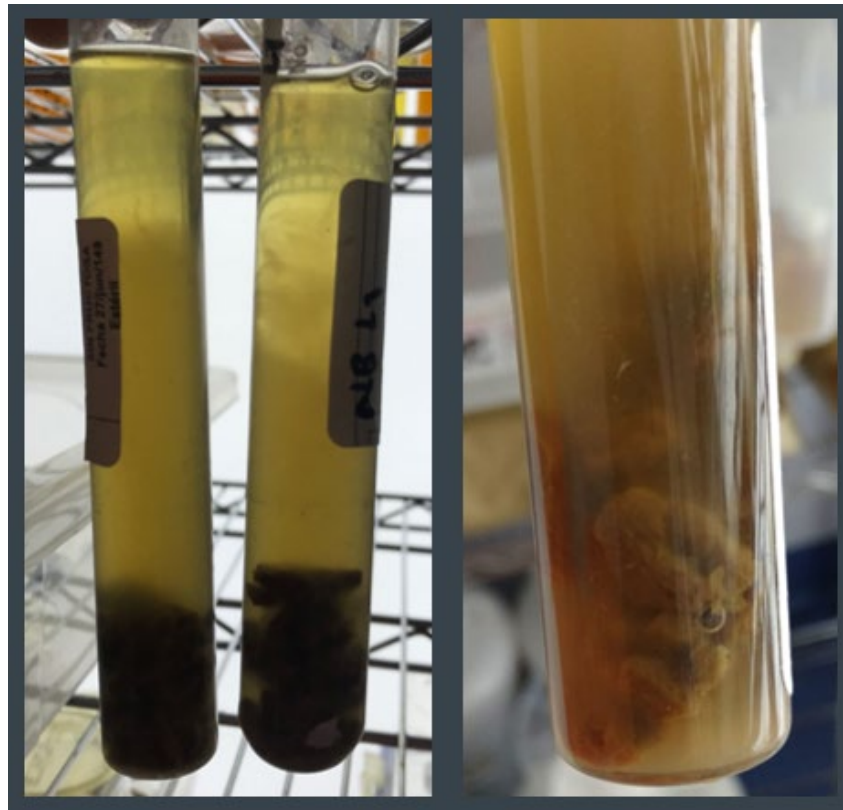


Fig. 16. Pasaje R1 al momento de fin de incubación. Se observa leve turbidez e inicio de generación de gas.

En la figura 17 se puede observar por Tinción de Gram la diferencia entre una semilla envejecida donde el tubo tenía exceso de turbidez y elevación de carne (17a) y una semilla en estado exponencial, con leve turbidez en tubo y evidencia de burbujas de gas (17b).

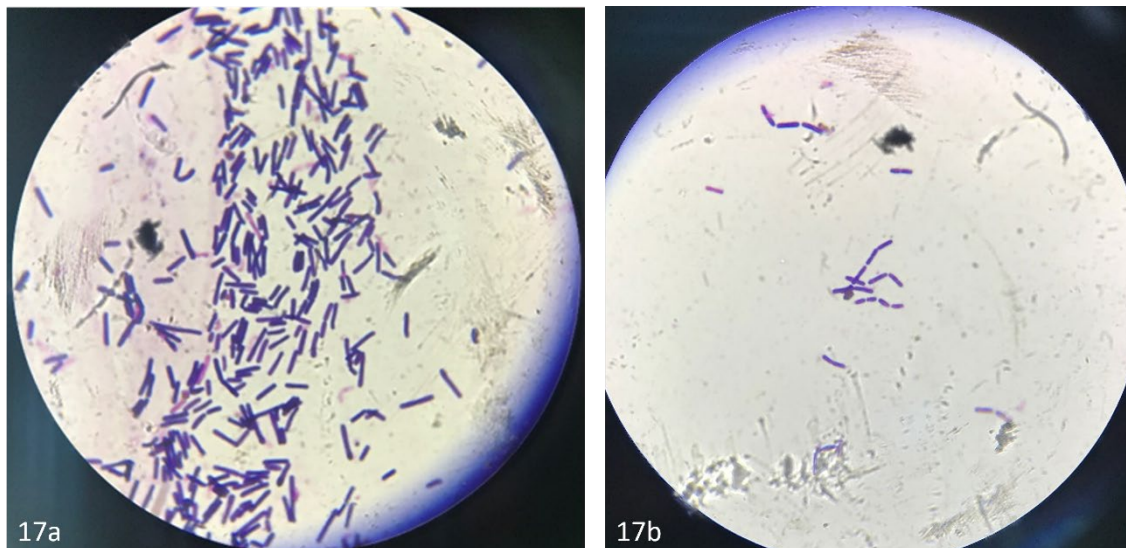


Fig. 17. 17a Gram sobre muestra de semilla con elevación de la carne e importante turbidez, semilla ya entrada en estado de latencia. 17b Gram sobre muestra de semilla con leve turbidez y presencia de gas, bacilos en estado de división celular.

La etapa más crítica de la expansión de la semilla es el pasaje *R3*, dado que es el cultivo con el cual se va a inocular el tanque fermentador. Es de suma importancia que este cultivo se encuentre en fase exponencial de crecimiento para propiciar un adecuado crecimiento sin generar demoras al inicio del cultivo como se mencionó anteriormente. A diferencia de los pasajes *R1* y *R2*, el recipiente contenedor es de polipropileno blanco opaco, por lo que no es posible hacer un seguimiento visual de turbidez o presencia de gas ni espuma (Figura 18).



Fig. 18. Pasaje *R3*, balones polipropileno blanco.

Debido a esto, la única forma de evaluar la incubación fue hacer un monitoreo de los balones durante las 24 horas de incubación. En primera instancia se planteó tomar muestras durante todo el período de incubación con el fin de evaluar crecimiento medido por densidad óptica y control de pH. Para la medición de densidad óptica se utiliza el equipo móvil *Ultraspec 10 Cell Density Meter*, el cual mide la densidad de las células en suspensión a 600 nm, utilizando como control blanco el medio *Moedema 13* sin sembrar.

Se decidió muestrear uno de los cuatro balones sembrados, para ello, en cada tiempo de muestreo se acarrea desde la sala de incubación hasta la cabina de flujo laminar el balón definido, cabe destacar que la incubación de este pasaje se realiza de forma estática, por lo que el movimiento y la agitación para la toma de muestra fueron realmente contraproducentes, generando un enlentecimiento importante del crecimiento en comparación con los otros 3 balones sembrados. Los resultados no solo no eran representativos de lo que sucedía realmente dentro de los balones incubados, sino que también generaban una semilla deficiente para ser sembrado el tanque industrial.

Se decide entonces sembrar cinco balones *R3*, dedicando cuatro de ellos a ser balones semilla, destinados a la siembra de tanque industrial, los cuales fueron muestreados únicamente al fin del período de incubación; y un quinto balón que sería el balón Centinela, el cual fue muestreado durante toda la incubación. El primer lote centinela fue muestreado cada una hora, lo que

nuevamente demostró que tanta manipulación tiene un impacto negativo en el crecimiento bacteriano. Se decide entonces un plan de muestreo inicial al momento de la siembra, y luego de pasadas las primeras 9 horas de incubación, hacer un monitoreo cada 2 horas.

Para que el crecimiento dentro del balón Centinela no sea afectado por el intenso movimiento desde la estufa hacia la cabina de flujo laminar en cada operación de muestreo, se diseña una tubuladura de muestreo que permite la toma de muestra aséptica (Figura 19).



Fig. 19. Tubuladura de muestreo aséptico para balones de pasaje R3. Sobre botella schott se genera vacío utilizando pipeteador automático, una vez colectada la muestra, para evitar la recirculación de solución hacía zona aséptica de la tubuladura, se interrumpe el flujo con la llave indicada con flecha azul.

Este dispositivo de muestreo permitió, hacer un seguimiento durante toda la incubación del pasaje R3 dentro del cuarto estufa, sin necesidad de mover el balón más allá de una leve agitación para homogenizar la muestra previo a ser colectada.

Se realizó seguimiento a 10 lotes industriales, de los cuales 7 fueron con balón centinela y permitieron identificar y definir los tiempos adecuados de incubación y corte de cultivo, por lo que

los últimos 3 simplemente fueron muestreados previos a la siembra de tanque industrial habiendo optimizado los tiempos de cultivo con los 7 lotes anteriores.

En la Figura 20 podemos evaluar la cinética de crecimiento medida por densidad óptica (OD_{600}) durante las 24 horas de incubación, registrando un valor máximo de 1.5 OD_{600} . En función de la evolución observada en los balones centinela se puede determinar que en las primeras 10 a 12 horas corresponde a una fase de latencia, donde las bacterias se adaptan al medio. Se define entonces un adecuado punto de corte de incubación de balones *R3* entre las 15 y las 18 horas, lo que correspondería con el inicio de la fase exponencial de crecimiento bacteriano.

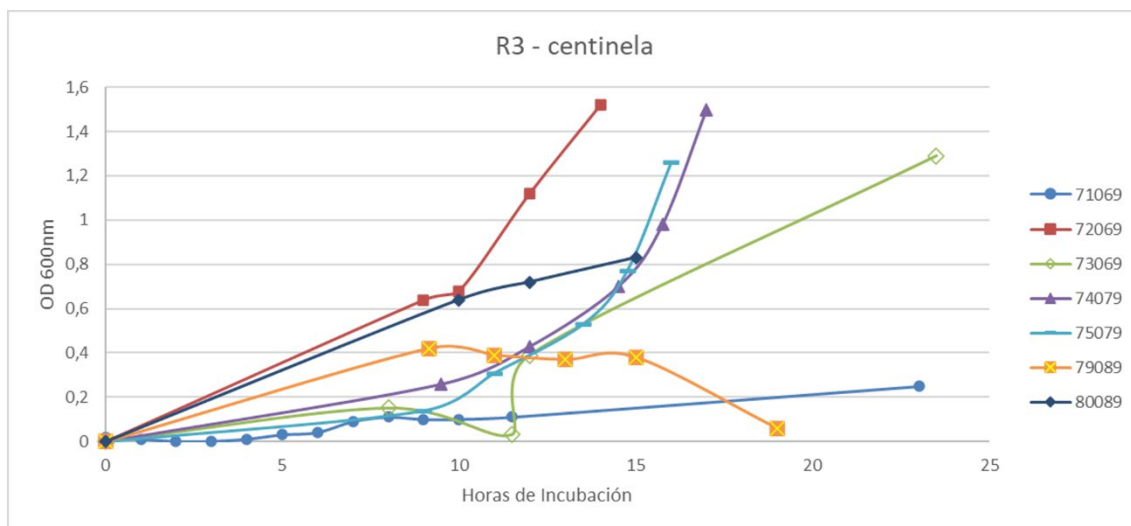


Fig. 20. Pasaje R3 balón centinela, seguimiento de densidad óptica durante período de incubación.

En la Figura 21, se registran los valores de densidad óptica al final de cada periodo de incubación de cada uno de los cuatro balones destinados a ser semilla del tanque industrial, datos registrados para 10 lotes industriales. Evaluando la gráfica, confirmamos que el mejor tiempo de corte para la incubación es entre las 16 y las 18 horas, donde la determinación de Densidad Óptica alcanza valores entre 1 y 1.5. Se identifican los balones del lote 73069 como valores outliers, dado que no se pudo repetir ese patrón.

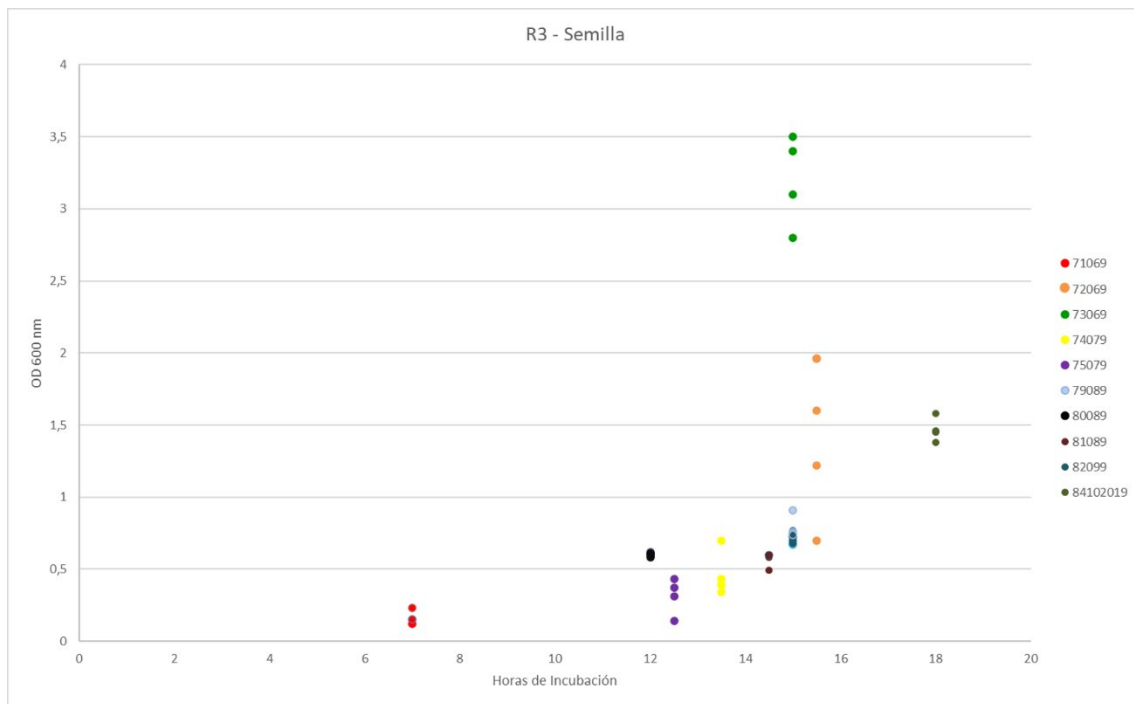


Fig. 21. Pasaje *R3* balones semilla. Control de densidad óptica al fin de incubación cada balón. Cada lote cuenta con un conjunto de 4 balones destinados a siembra de tanque industrial y que son muestreados únicamente al momento de Fin de Incubación del pasaje. Se identifican los 4 balones de cada lote por color. Aquí no se incluyen los resultados de los balones centinela.

Otro de los puntos importantes durante el muestreo es el seguimiento del pH (Figura 22). El estudio de balones centinela permitió identificar que luego de las 15 horas de incubación, se registra una bajada en el pH del medio, lo que se relaciona con la fase exponencial de crecimiento bacteriano, dado que las reacciones metabólicas durante el crecimiento y la adaptación al medio disparan cambios en el pH extracelular ²².

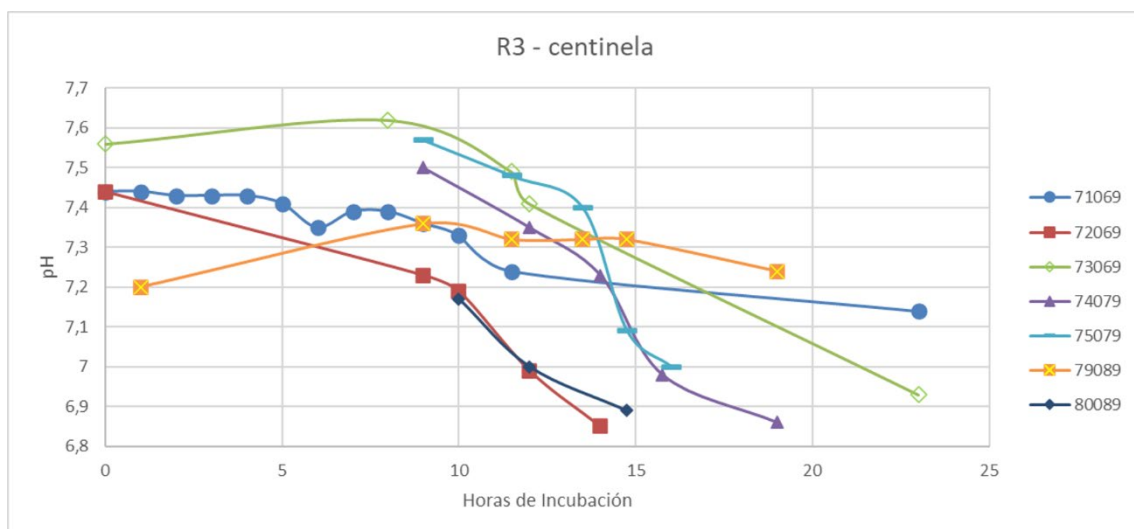


Fig. 22. Pasaje *R3* balón centinela, seguimiento de evolución de pH durante período de incubación.

Para poder definir un fin de incubación del pasaje R3 que nos permita tener una semilla en fase exponencial al momento de siembra del tanque industrial, y considerando los resultados de los balones centinela, y fines de incubación de balones semilla, se define asignar un período máximo de incubación de 15 ± 1 hora.

A modo de evidencia y para poder comparar el comportamiento de diferentes lotes, se presentan los lotes L74 y L75 en la misma gráfica, y se muestran los parámetros evaluados durante la prueba: Densidad Óptica (Figura 23) y pH (Figura 24). Se registran los resultados tanto para el balón centinela, como para los balones dedicados a ser semilla industrial, para estos último el Fin de Incubación se dio antes de las 15 hs. Los balones centinela continuaron siendo incubados posterior a la siembra del tanque a modo exploratorio. En las gráficas se incluye el seguimiento de la cinética de ambos parámetros para el balón centinela (línea continua azul con rombos para L74, línea continua anaranjada con cuadrados para L75) y el resultado de los cuatro balones destinados a inocular del tanque industrial, que fueron muestreados únicamente previo a la siembra (identificados como B1, B2, B3, B4 para cada lote con un círculo de diferentes colores). Se resalta en celeste el período de tiempo de 15 ± 1 hora, en este tiempo optimizado de cultivo se puede evidenciar las mejores condiciones de OD₆₀₀ y pH. Muestreando los balones centinela se arroja un resultado de OD₆₀₀ de 0.6 – 1.3 y de pH entre 6.9 – 7.2., por lo que confirmamos este tiempo como Fin de Incubación Optimizado para Balones. Esto confirma lo ya mencionado anteriormente.

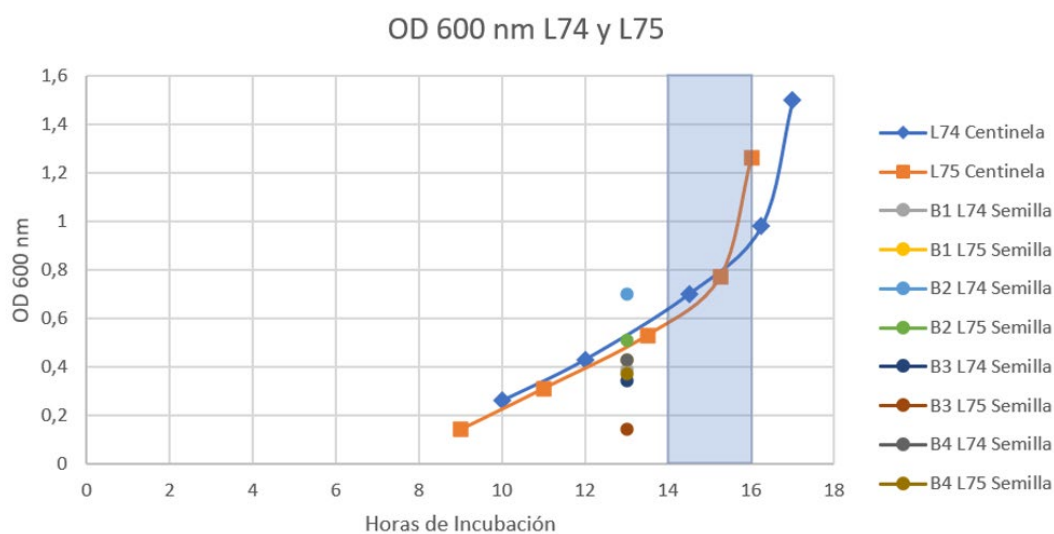


Fig. 23. Seguimiento de evolución de OD durante período de incubación de balones centinela para L74 y L75, en comparación con resultados puntuales al fin de incubación para balones semilla B1, B2, B3, B4: L74 y L75. Los balones centinela continuaron siendo incubados posterior a la siembra del tanque a modo exploratorio.

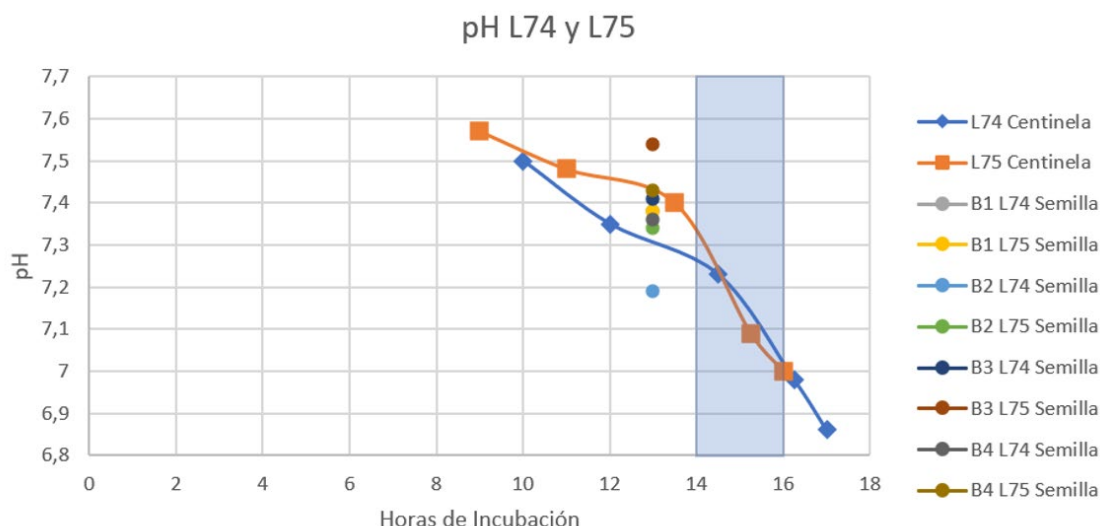


Fig. 24. Seguimiento de evolución de pH durante período de incubación de balones centinela para L74 y L75, en comparación con resultados puntuales al fin de incubación para balones semilla B1, B2, B3, B4: L74 y L75. Los balones centinela continuaron siendo incubados posterior a la siembra del tanque a modo exploratorio.

Se define entonces que cumplidas las 15 ± 1 hora todos los balones semilla de los lotes industriales serán muestreados, evaluando los parámetros pH y Densidad Óptica, si los balones se encuentran en un rango de pH de 6,5 - 7 y un valor de OD_{600} de 0,8 – 1,3, se confirma entonces el fin de incubación, de no ser así se debe notificar a la gerencia de planta para redefinir continuar con la incubación o iniciar un nuevo plan de semilla.

Concluyendo, los parámetros de tiempo, pH y OD_{600} , determinan lo que será el tiempo total de incubación del inoculo para siembra de tanque fermentador.

Estudio a nivel de tanque fermentador:

El cultivo principal debe ser estudiado desde distintas perspectivas. En primer lugar, es primordial contar con una semilla en fase exponencial de crecimiento para inocular el medio, punto que fue cubierto en el estudio de semilla visto anteriormente y en los que destacamos que el tiempo de incubación de cada fase de semilla debe ser seguido y respetado rigurosamente, indicadores como leve turbidez y presencia de gas indican el fin de incubación de pasaje *R1* y *R2*, mientras que para el pasaje *R3*, la evaluación a las 15 ± 1 de parámetros como pH y la OD_{600} son críticos para decretar el fin de cultivo y obtener una semilla óptima. En segundo lugar, se debe evaluar el impacto de las condiciones de cultivo dentro del tanque industrial. Como se describió en la parte del proceso productivo, tradicionalmente el cultivo de este clostridio lleva ajustes a nivel de pH una vez que se observa que el mismo baja a valores menores de 7,00. Intentado mantener el pH en un rango de 7,00-7,60, y dado que los tanques fermentadores disponibles en planta no cuentan con la posibilidad de hacer un ajuste automático suave y de manera continua, se hacen agregados masivos de entre 6 a 10L de NaOH 10N agitando el cultivo por varios minutos, como describimos antes la fermentación de clostridios como *C. novyi* requiere de condiciones estrictamente anaerobias, por lo cual se teoriza que el agregado de gran volumen de NaOH junto con la agitación, genera un impacto negativo en el crecimiento bacteriano, así como se demostró a nivel de semilla cuando los balones centinela se sometían a agitación y movimientos excesivos. Con la intención de mejorar las condiciones

anaerobias de incubación, el alcance de este trabajo comprende el estudio de no hacer ajustes de pH durante la incubación, dejando que el pH extracelular fluctúe de forma natural e implementar sobre el medio industrial un paso de calentamiento a 80°C por 15 minutos previo a la siembra del inóculo, con esta medida generamos una desoxigenación rápida del medio previo a la siembra, simulando la desoxigenación por autoclave sobre los reservorios semilla una vez acondicionados.

Un problema que se presentaba era evaluar el impacto de estos cambios de una forma precisa, y poder contar con la posibilidad de que se hiciera un seguimiento *in situ* de la toxina dentro del tanque industrial con el fin de conocer su cinética de producción. Hasta el momento, solo se contaba con titulación de toxina mediante Dosis Letal 50, y cuantificación de toxoide mediante técnica de ELISA, pero ambos métodos limitaban la evaluación del lote. Para el caso de la titulación por DL50%, la evaluación se podía realizar sobre la muestra de Fin de Cultivo, o sea, una vez terminada la fermentación, y los resultados estarían luego de 72 hs iniciada la prueba. Para el caso de la cuantificación de toxoide, la prueba se realiza luego del procesamiento *down-stream*.

Otro punto importante para destacar es la duración total del cultivo principal. En 2011, el Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico, Facultad de Química, en colaboración con Prondil S.A., desarrollaron un método de monitoreo de producción de *toxina alfa* con inmunoensayo de aglutinación en látex, en ese estudio evaluaron que la producción de toxina se detectaba a partir de las primeras 14 horas de incubación e iba en incremento durante las siguientes 6 horas, luego se observaba una meseta en la producción por 7 horas más, esta información sumada a un histórico de producciones industriales definía una duración de la fermentación principal no menor a 24 y no superior a 48 horas²³. Era de prioridad entonces, optimizar una metodología de seguimiento del cultivo *in situ* que no solo permitiera conocer el comportamiento dentro del fermentador, si no también definir un correcto punto de corte de incubación cuando la cantidad de toxina estuviera en su punto máximo de producción.

Dado que a nivel de planta al momento ya se contaba para la evaluación y aprobación de rendimientos del antígeno *C. tetani* con la técnica conocida como Inmunodifusión radial (IDR), descrita en detalle en la sección 3.2.1., se plantea entonces desarrollar la misma para el antígeno en estudio *C. novyi* Tipo B. Como mencionamos en dicha sección, la técnica de IDR desarrollada permite hacer una evaluación de la cantidad de toxina que se está produciendo dentro del tanque en las sucesivas horas de incubación gracias a que es una técnica que mide exclusivamente la interacción antígeno-anticuerpo.

En primer lugar, esto nos permitió evaluar de forma confiable la producción de toxina mediada por el cambio de no ajustar el pH extracelular durante la fermentación (Figura 25).

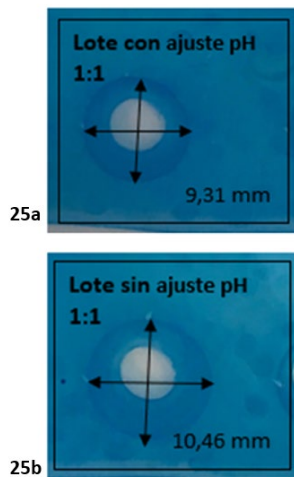


Fig. 25. Gel de IDR sembrando muestras fin cultivo sin dilución. 25a Lote con ajuste de pH durante la fermentación presenta menor diámetro de halo en comparación con imagen 25b donde se presenta un Lote sin ajuste de pH durante la fermentación.

Si procesamos mediante estadística el resultado de todos los lotes evaluados antes y después de implementado el cambio de no ajustar el pH extracelular, así como la incorporación del mejoramiento del inóculo y desoxigenación del medio previo a la siembra, vemos que los lotes sin ajuste de pH muestran un valor de media en titulación de toxina por DL50/mL mayor que los lotes con ajuste de pH (Figura 26).

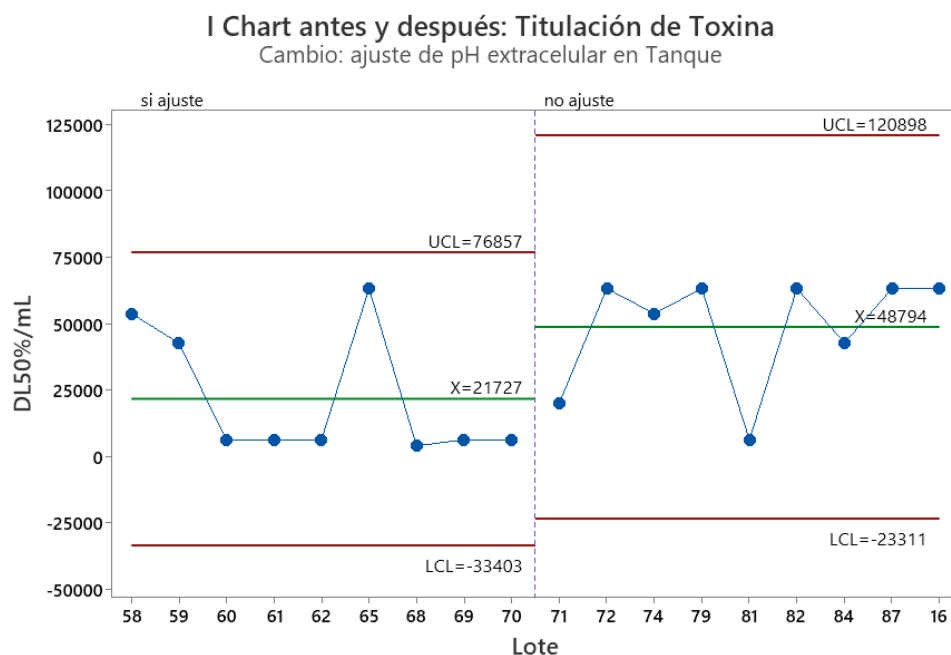


Fig. 26. Evaluación del proceso mediante Control Chart en Minitab. Se observa un gráfico de “Antes y Después” donde se monitorea el resultado del proceso expresando Título de Toxina como LD50%/mL.

Para confirmar que dicho cambio en la media es significativo, se corre en Minitab un Test de Medias, donde se considera como Hipótesis Nula (H_0) que *No hubo cambio significativo*, y como Hipótesis

Alternativa (Ha) que *El proceso sí se movió significativamente*. Evaluamos el valor de Pearson (p-Value) y al ser este menor que 0.05 rechazamos la Hipótesis Nula y aceptamos la Hipótesis Alternativa, validando el cambio significativamente (Figura 27).

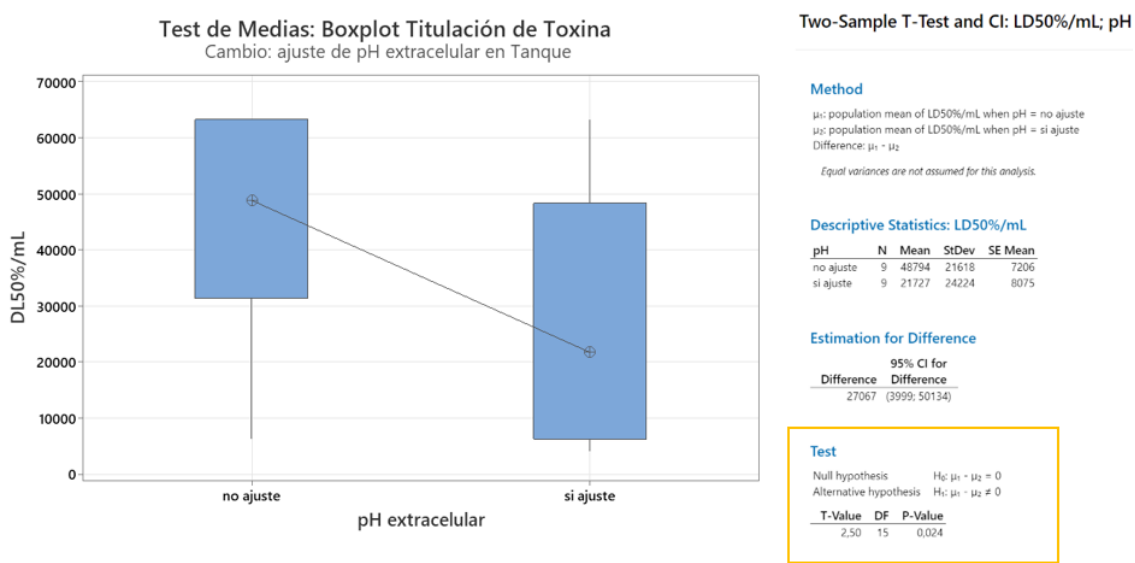


Fig. 27. Evaluación mediante Test de Medias en Minitab del cambio a no ajustar el pH extracelular durante la fermentación. Resultado el Test: p-Value = 0.024 confirma que el proceso se movió significativamente, se acepta el cambio como válido.

En segundo lugar, la técnica de IDR fue de gran ayuda para optimizar los tiempos totales de incubación, evidenciando que luego de las 30 horas de fermentación la producción máxima de toxina se mantenía estable. A modo de evidencia se adjunta la figura 28, donde se puede ver resultado de aplicar la técnica de IDR para medir la evolución de la toxina del lote L82. En la imagen 28a se presenta el gel de IDR donde cada muestra fue sembrada en dos condiciones a modo de screening: sin dilución y con una dilución al medio. En cada bloque delimitado en el gel, se identifican las horas de muestreo de tanque, lo que se rotula como *X hr incub*. El diámetro del halo es representativo de la cantidad de toxina en la muestra. A la derecha del gel, la imagen 28b se representa de forma gráfica el diámetro del halo en milímetros en función de los tiempos de incubación.

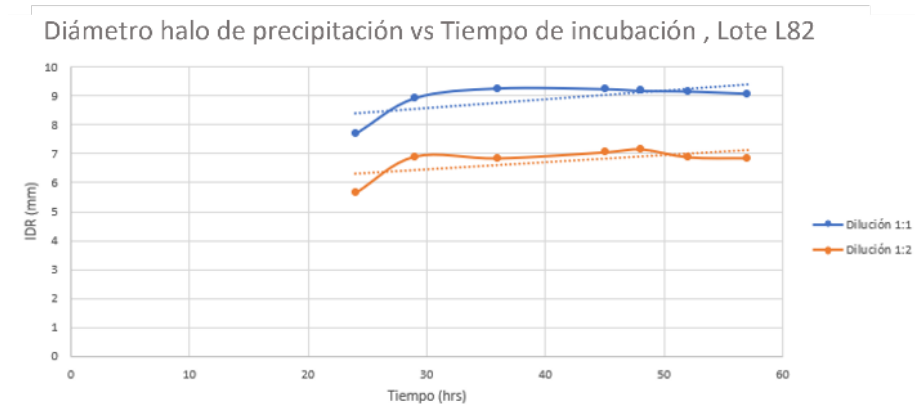


Fig. 28. Cinética de producción de toxina evaluada mediante técnica de IDR para el Lote L82. 28a Gel de IDR con incubación de muestras a los diferentes tiempos de muestreo de tanque. 28b Representación gráfica del diámetro de cada halo de precipitación, se observa como luego de las 30 horas de incubación se obtiene una meseta en la producción de toxina.

Habiendo evaluado la cinética de producción de toxina de 5 lotes industriales, y comprobando que todos presentaron un comportamiento similar de generación de meseta a nivel de IDR, se toma esta observación como suficiente para definir un punto de corte de incubación para el cultivo principal, dado que cumplidas las horas en las que inicia la meseta no se obtendría más toxina por más horas de incubación que se le dé al cultivo.

Para poder definir los tiempos en los que ocurre esta meseta, era necesario contar con los resultados de IDR, pero una vez sembradas las muestras en el gel son necesarias 72 horas de incubación para poder ser revelado el gel. Se necesitaba definir entonces un parámetro de medición del cultivo que tuviera una correlación con el resultado de dicho test de IDR y que representara un resultado inmediato de lo que sucedía dentro del fermentador.

La evolución del pH extracelular y el crecimiento de la Densidad Óptica utilizando el equipo móvil *Ultraspec 10 Cell Density Meter*, eran valores que se median históricamente durante la fermentación, se correlacionaron entonces las cinéticas de los tres parámetros disponibles.

Se observó que, para todos los lotes evaluados, una vez identificado el valor máximo de Densidad Óptica durante la fermentación, entre las 10 y las 12 horas posteriores de incubación se podía evidenciar el punto máximo de producción de toxina evaluado mediante IDR. Con respecto al parámetro de pH era de utilidad para identificar el comienzo de la fase exponencial de crecimiento del clostridio, pero una vez iniciado el crecimiento, este parámetro se mantenía constante, por lo que el pH no representaba de utilidad para su uso como indicador de fin de incubación.

Si evaluamos la figura 29, vemos que se presentan tres tipos de gráficos, de arriba hacia abajo: cinética de producción de toxina (IDR), cinética de Densidad Óptica (OD_{600}) y cinética de pH extracelular. En todos los casos se observa que la meseta de producción de toxina inicia máximo 12,5 horas después de que se da el valor máximo de Densidad Óptica.

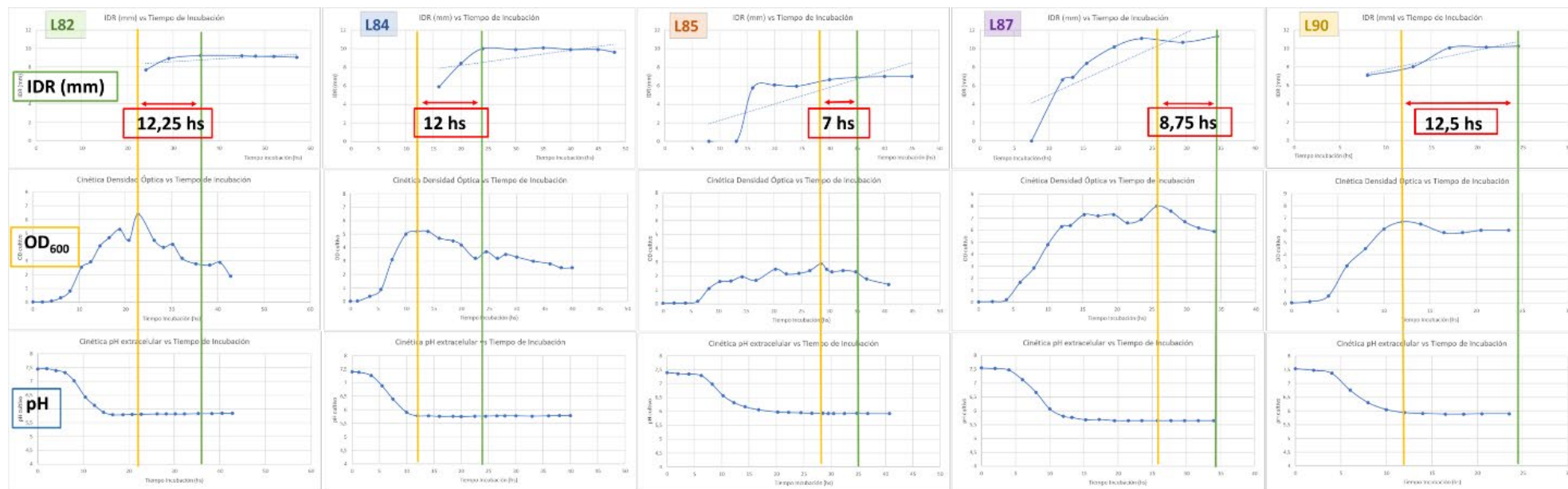


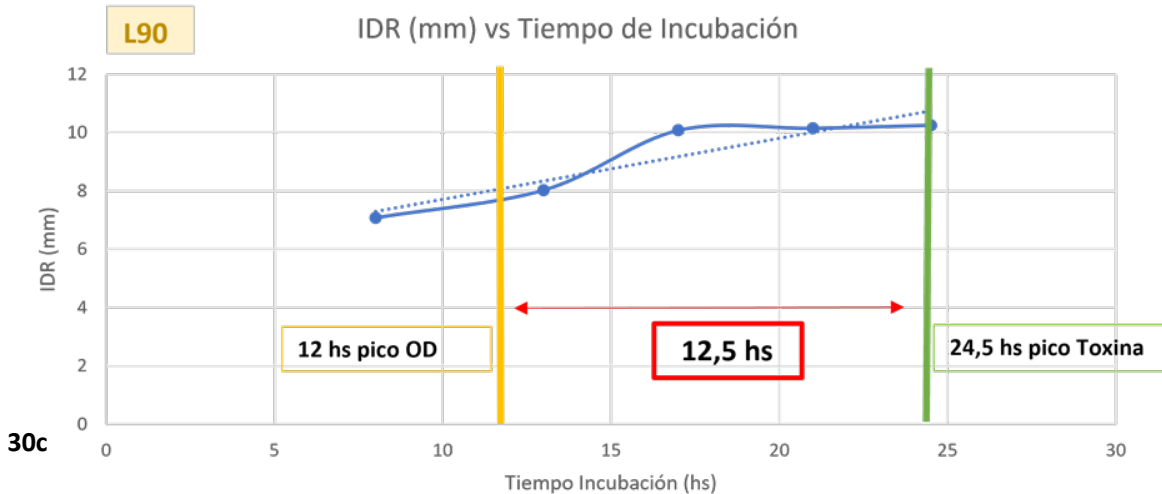
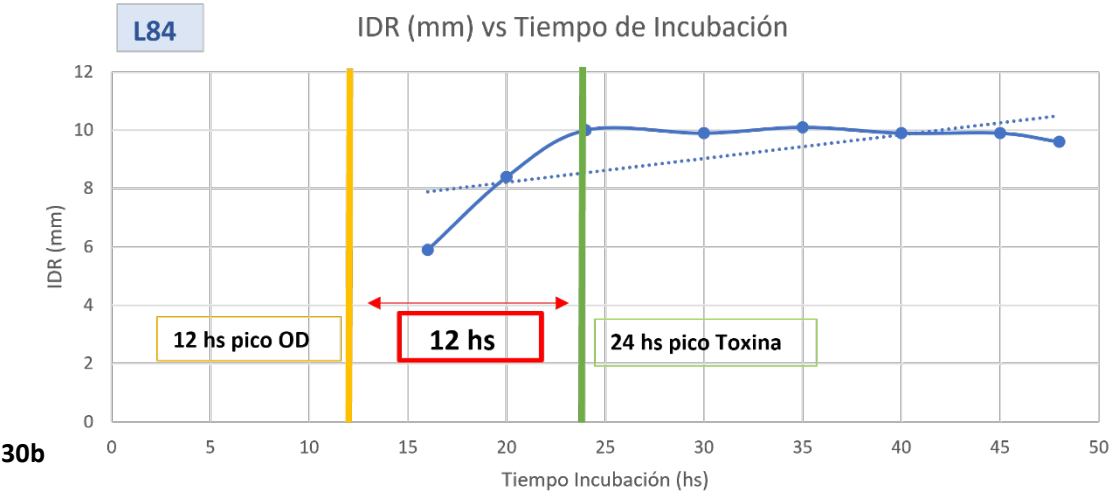
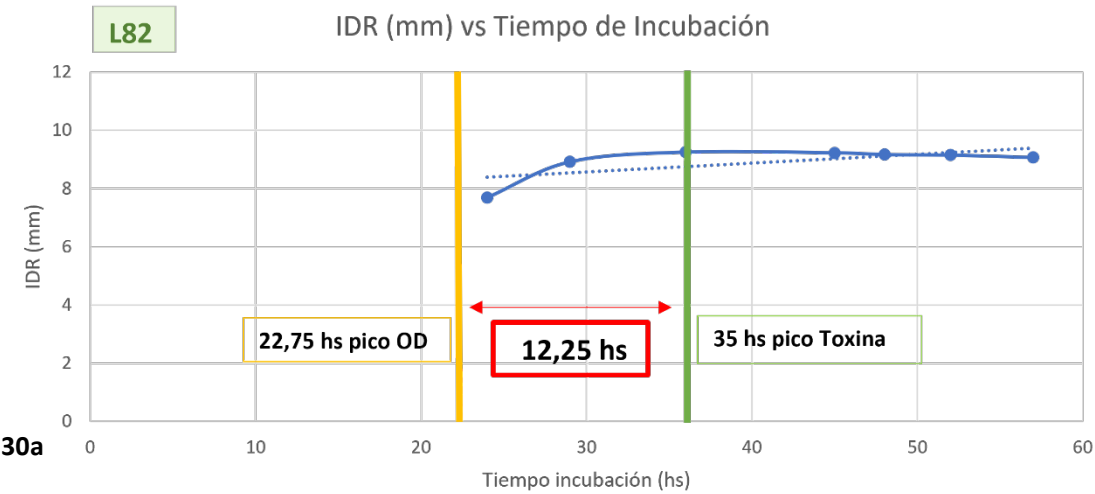
Fig. 29. Comparación de evolución de lotes L82, L84, L85, L87 y L90.

Gráficas de arriba hacia abajo:

- cinética de producción de toxina (Halos IDR en mm) vs. Tiempo de Incubación (hs)
- cinética de densidad óptica (OD_{600}) vs. Tiempo de Incubación (hs)
- cinética de pH extracelular vs. Tiempo de Incubación (hs)

Con una vertical amarilla se indica el momento de máximo OD_{600} (según grafica de la línea del medio) y con una vertical verde el momento de máxima producción de toxina (según gráfica de la primera línea). En rojo los tiempos entre ambos máximos.

En detalle las gráficas de cinética de IDR para cada uno de estos lotes (Figura 30).



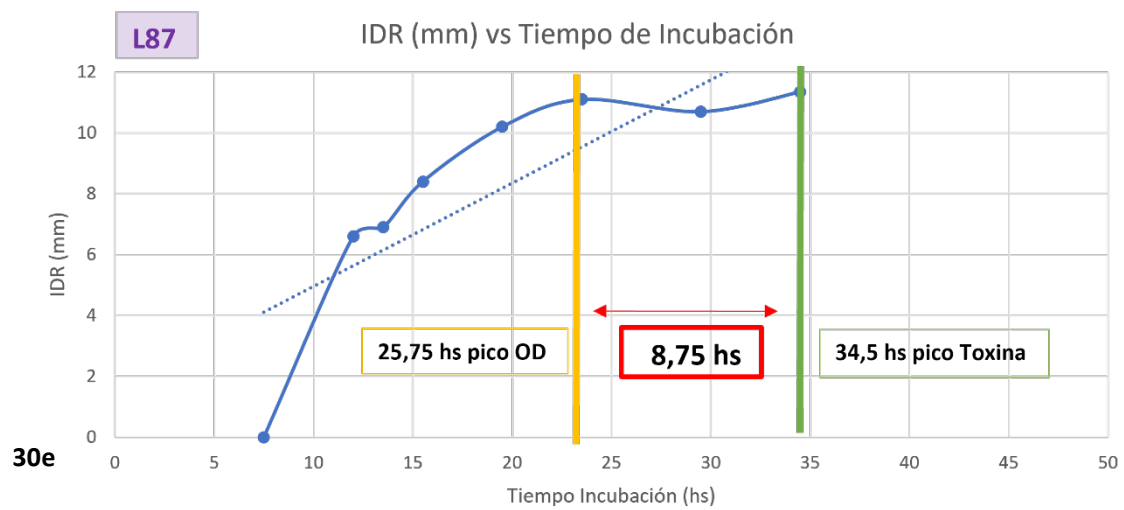
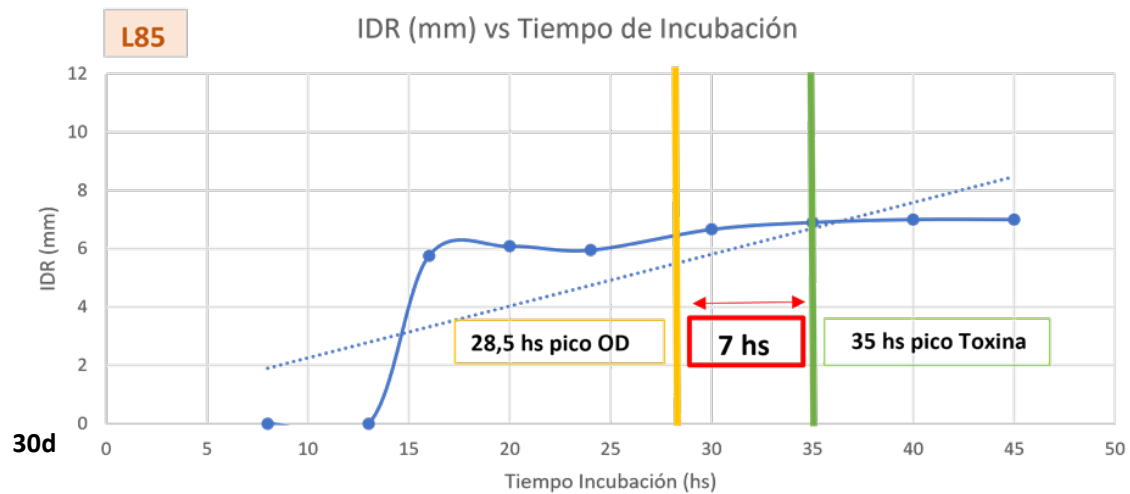


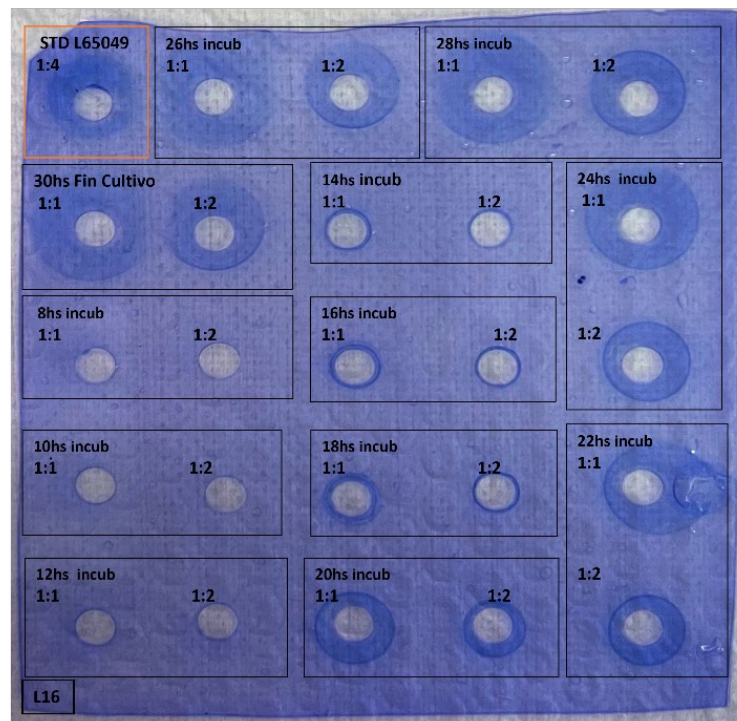
Fig. 30. Cinética de producción de toxina evaluada mediante IDR, lotes L82, L84, L85, L87 y L90.

- Vertical en amarillo indica el momento de máximo OD₆₀₀.
- Vertical verde el momento de máxima producción de toxina.
- En rojo los tiempos entre ambos máximos.

Se confirma entonces que teniendo una valoración que arroja un resultado instantáneo de la evolución del cultivo como es la determinación del parámetro de Densidad Óptica, y que se correlaciona directamente con el resultado de IDR, se define identificar durante la fermentación el punto máximo de OD₆₀₀ y asignar entonces 11 ± 1 horas más de incubación para luego definir el momento de *Fin de Cultivo*. Se asigna este período de tolerancia de 1 hora para contener la demora de los tiempos productivos, como ser, coordinación de inactivación del lote en cuestión junto con otras tareas que se están llevando a cabo en el área.

Gracias a la posterior adquisición del equipo de cromatografía de inmutioafinidad, FPLC, se pudo hacer un seguimiento de producción de toxina dentro del fermentador obteniendo un resultado *in situ* y a los 20 minutos de haber colectado la muestra. En la sección 3.2.2.3 se describe la aplicación de la metodología. Con este equipo se estudió nuevamente la cinética de toxina para confirmar que los tiempos de cultivo definidos utilizando la técnica de IDR como referencia fueron los adecuados.

Para el primer lote evaluado (L16) se tomaron muestras cada 2 horas a partir de las 8 horas de sembrado el tanque y hasta el fin de incubación. A nivel de planta, se comienza el seguimiento mediante densidad óptica nuevamente contando con el equipo móvil *Ultraspec 10 Cell Density Meter*, a las 18 horas de iniciado el cultivo se presenta el valor máximo de densidad óptica, y siguiendo los lineamientos definidos anteriormente por este trabajo, se define el tiempo de fin de incubación a las 12 horas posteriores de haber identificado este punto; por lo que el Fin de Cultivo se dio a las 30 horas de sembrado el tanque. Las muestras colectadas durante la incubación se evaluaron por técnica de IDR (Figura 31), donde se identifica que a las 18 horas se presentado el valor máximo de OD (imagen 31d) y a las 8 horas posteriores: 26 hs totales, se presenta el nivel máximo de producción de toxina (imagen 31c), seguido por una meseta en dicha producción. Sin embargo, al ser evaluadas estas muestras por FPLC (imagen 31b) se observa que la meseta identificada en la reacción antígeno anticuerpo que registra el IDR no se presenta en la reacción antígeno anticuerpo monoclonal de la cromatografía de inmutioafinidad, en cambio, se observa como la gráfica continua en evolución.



31a

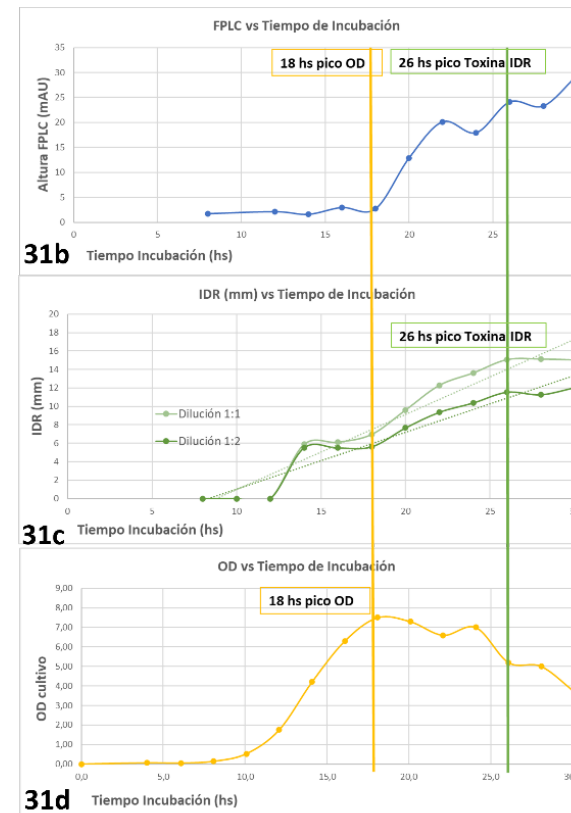


Fig. 31. En la imagen 31a se observa el gel de IDR para el primer lote evaluado, L16, donde se sembraron las muestras tomadas cada 2 horas durante la incubación, desde las 8 horas de sembrado el tanque hasta las 30 horas, momento en que se determina el Fin de Cultivo. En la imagen 31d se presenta el seguimiento del cultivo por Densidad Óptica, a las 18 horas de incubación se identifica el valor máximo de OD₆₀₀, registrado en la imagen usando una vertical amarilla. La imagen 31c presenta el resultado de la medición de los halos del gel de IDR, lo que representa la cantidad de toxina presente en cada hora de muestreo, y se identifica el comienzo de la meseta por una vertical verde a las 26 horas de cultivo. La imagen 31b presenta la medición mediante FPLC de las muestras tomadas, lo que representa la cantidad de toxina por cromatografía de inmunoafinidad.

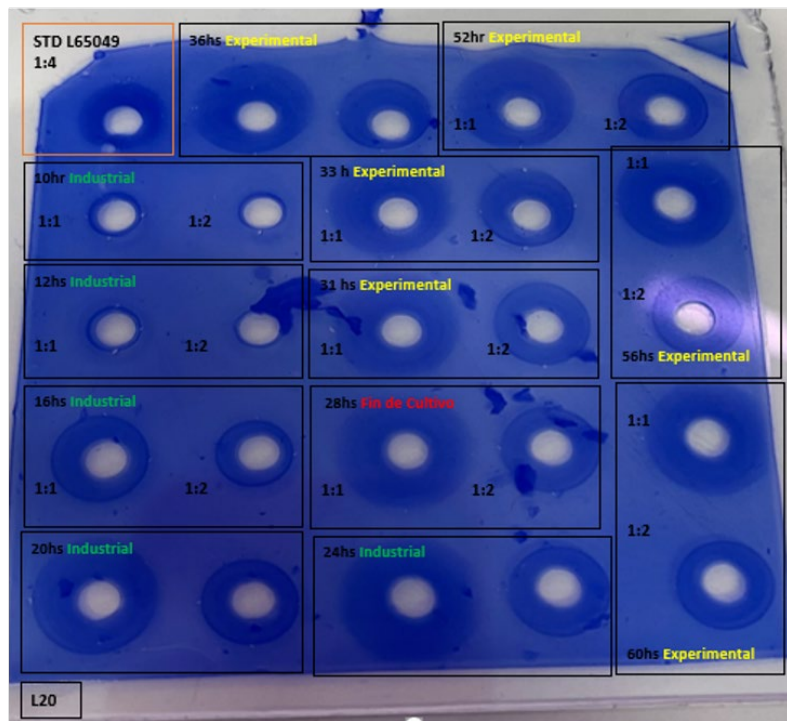
Esto genera la incertidumbre de que los tiempos de incubación definidos anteriormente no sean totalmente correctos, habiendo margen para poder incubar al clostridio más horas y obtener así mayores rendimientos de toxina.

Dado que para poder modificar nuevamente a nivel de Producción Industrial los tiempos de incubación de un lote comercial se debe tener mayor evidencia, se decide entonces para el próximo lote industrial tomar de forma aséptica una muestra de 1 litro de cultivo al momento en que se determina el Fin de Cultivo y continuar de manera experimental la incubación a nivel de laboratorio. La muestra será incubada de manera estática en estufa a 37°C, en primera instancia por el doble de tiempo, agitando únicamente para tomar la muestra y con el fin de conocer la cinética de la toxina utilizando el equipo FPLC.

El segundo lote disponible para ser monitoreado fue el L20, se comenzó el seguimiento del tanque fermentador muestreando el mismo cada 2 o 4 horas desde las 10 horas de iniciada la siembra y hasta el momento del Fin de Cultivo. El seguimiento a nivel de planta por la Densidad Óptica determinó que el Fin de Cultivo se diera a las 28 horas de sembrado el tanque, 14 horas luego de identificado el valor máximo de OD₆₀₀. Se tomó entonces la muestra de Fin de Cultivo sin inactivar para continuar la incubación a nivel experimental y se fueron colectando muestras hasta cumplidas las 60 horas totales de incubación.

El estudio de dichas muestras por IDR (Figura 32), mostró que efectivamente el nivel máximo de producción de toxina y la subsiguiente meseta se presentaba alrededor de las 26 – 28 horas de incubación (imagen 32c), mientras que evaluando las muestras por FPLC, el máximo se daba sobre las 36 horas de incubación y luego de las 36 horas se identifica una caída importante en la cantidad de toxina en la muestra (imagen 32b).

Esa pérdida de toxina en la muestra que se identifica a nivel del FPLC no es observada a nivel del IDR. Dado que la reacción antígeno anticuerpo en la metodología de IDR utiliza anticuerpos policlonales que fueron originalmente producidos con inmunógenos no purificados, el policlonal en IDR estaría reconociendo otros factores que no son necesariamente toxina o fragmentos de esta. Se entiende entonces que este tipo de anticuerpo puede estar enmascarando el deterioro de la *toxina alfa* contra *C. novyi B*, a diferencia del anticuerpo utilizado en FPLC que es monoclonal, por lo que específica y únicamente reconoce epítipo de *toxina alfa*.



32a

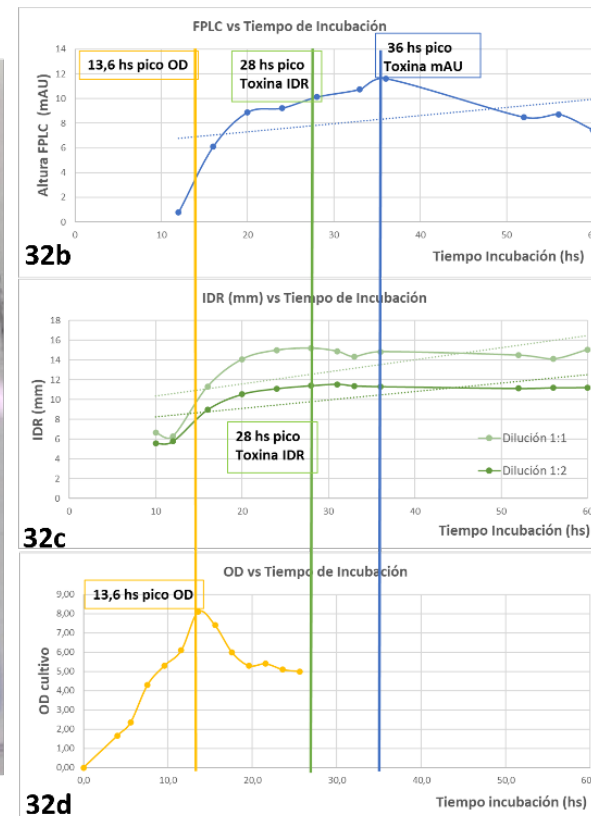


Fig. 32. En la imagen 32a se observa el gel de IDR para el lote L20, donde se sembraron las muestras tomadas durante la incubación a nivel industrial hasta Fin de Cultivo y las muestras tomadas en la incubación experimental a nivel de laboratorio. En la imagen 32d se presenta el seguimiento del cultivo industrial por Densidad Óptica, a las 13,6 horas de incubación se identifica el valor máximo de OD₆₀₀, vertical amarilla. La imagen 32c presenta el resultado de la medición de los halos del gel de IDR, lo que representa la cantidad de toxina presente en cada hora de muestreo, con una vertical verde se registra el comienzo de la meseta, 28 hs de incubación. La imagen 32b presenta la medición mediante FPLC de las muestras tomadas, lo que representa la cantidad de toxina por cromatografía de inmunoafinidad, con una vertical azul se identifica el nivel máximo de toxina en mAU (FPLC).

Con los resultados hasta ahora, tanto por IDR como por FPLC, se podría definir que entre las 24 y las 36 horas (Fig. 30, 31 y 32) se produce la mayor cantidad de toxina. Si comparamos la información de estos inmunoensayos con la información obtenida en 2011 por el inmunoensayo de aglutinación en látex, mencionado en la página 38, confirmamos lo visto en aquel momento, donde de una forma semicuantitativa, se detectaba que a partir de las 20 horas y hasta las 27 horas de cultivo se presentaba la producción máxima de toxina²³. Como mencionamos anteriormente este ensayo permitió en aquella oportunidad confirmar que un cultivo a nivel industrial debía como mínimo ser incubado por 24 horas dado que la producción de toxina se mantenía en una meseta luego de las 20 horas de cultivo y por las subsiguientes 7 horas. Esta información no presenta discrepancias por lo visto en la técnica de IDR, donde se registra una meseta alrededor de las 26 – 28 horas de incubación (imagen 32c). Sin embargo, gracias al ensayo por FPLC, también se identificó un posible deterioro de la misma luego de las 36 horas de incubación, donde la primera evidencia fue a las 52 horas de cultivo. Se decide entonces hacer el seguimiento de los próximos tres lotes planificados a nivel industrial con el fin de evaluar la cinética de estabilidad de toxina entre el Fin de Cultivo y su evolución en las posteriores 52 horas tras su incubación a nivel experimental.

El estudio de la cinética de estabilidad de los lotes disponibles evaluados confirmó que luego de las 36 horas de incubación la toxina disminuye en su cuantificación por FPLC (Figura 33), por lo que se decide continuar con la determinación inicial de detener los cultivos industriales dentro de las 10 a 12 horas de haber identificado mediante Densidad Óptica el punto máximo de OD. Lo que significa que la producción industrial de *C. novyi* tipo B conlleva luego de todos estos cambios un período de incubación total de aproximadamente 28 a 30 horas, contra un histórico de 48 horas.

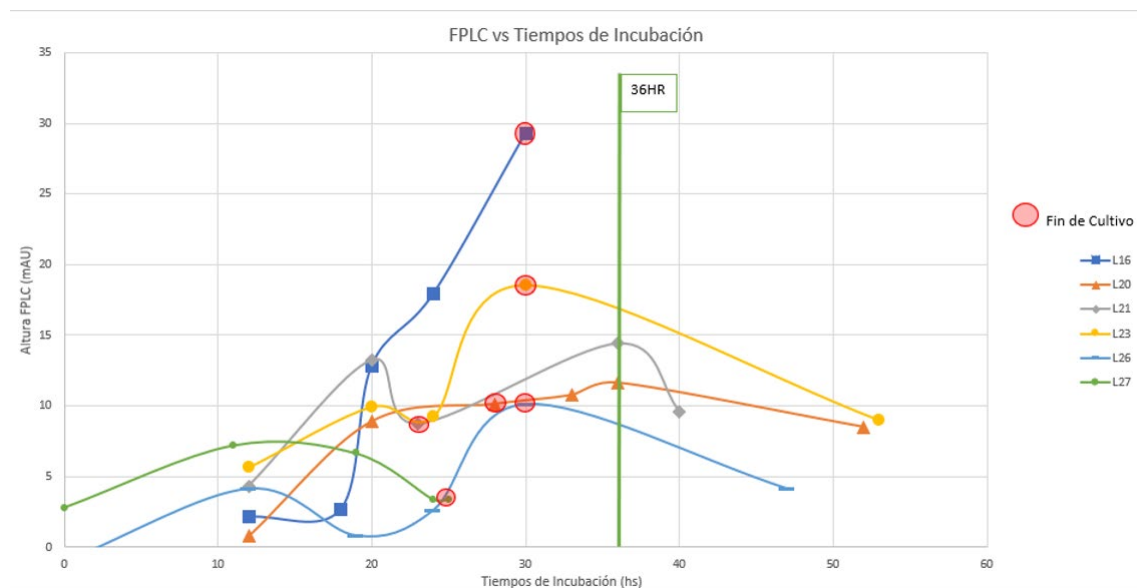


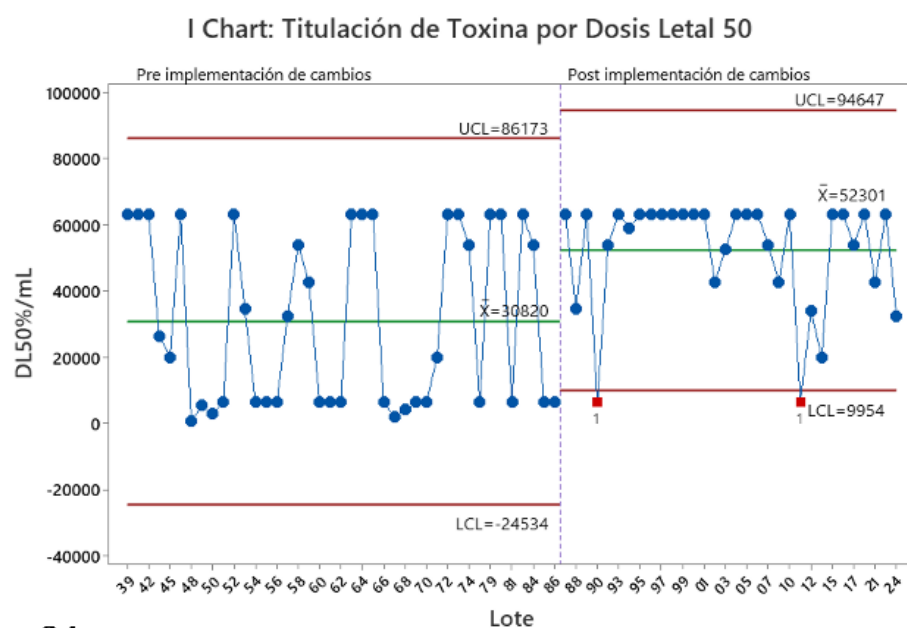
Fig. 33. Cinética de producción de toxina evaluada mediante FPLC de lotes industriales muestreados durante incubación en tanque hasta Fin de Cultivo y posterior incubación de 1 litro de cultivo en forma experimental a nivel de laboratorio para evaluar estabilidad de toxina durante la fermentación. Luego de las 30 - 36 horas de incubación se registra una tendencia a la baja en la cantidad de toxina presente en la muestra.

Resultados globales:

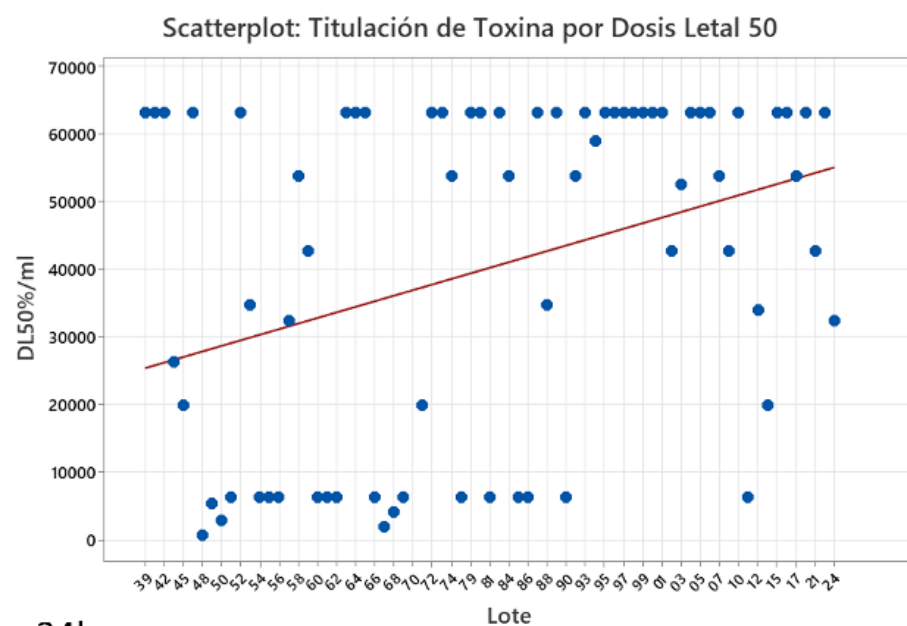
Organizando los resultados hasta ahora se puede confirmar que mediante el estudio de los distintos pasajes de semilla se logró obtener un inóculo en fase exponencial de crecimiento, lo que mejoró la siembra del tanque industrial y acortó los tiempos de la fermentación principal.

El estudio a nivel del fermentador mejoró los rendimientos de toxina, gracias a la desoxigenación del medio en el tanque previo a la siembra, a no realizar ajustes de pH extracelular durante las horas de incubación y la correcta determinación del punto de corte del cultivo. Conclusión a la que se llegó gracias al monitoreo de los cultivos y el desarrollo de una técnica de reacción antígeno - anticuerpo, que permite la evaluación, cuantificación y comparación de gran cantidad de muestras de toxina.

Con relación a los objetivos, en primera instancia se planteaba mejorar el rendimiento de la producción de toxina. Para poder hacer una evaluación contra la situación anterior al desarrollo de este trabajo y a la implementación del total de los cambios a nivel productivo, se comparan los resultados de titulación de toxina por Dosis Letal 50 entre lotes antes y después del cambio (Figura 34). Se observa como aumentó la media de Titulación por DL50% en los lotes que implementaron los cambios, habiendo un crecimiento desde 30820 DL50%/mL antes de comenzar este trabajo hasta 52301 DL50%/mL posteriormente (Figura 34a), lo que equivale a un aumento del 70% de DL50%/mL. En las gráficas Scatterplot se registra la correlación y tendencia luego de haber aplicado los cambios, y se observa que efectivamente la tendencia de producción de toxina en los sucesivos lotes va en aumento (Figura 34b).



34a



34b

Fig. 34. Monitoreo del cambio planteando un escenario “antes y después” evaluado mediante la Titulación de toxina por Dosis Letal 50. Imagen 34a los resultados se expresan en DL50%/mL, si se observa la figura en detalle se puede ver el salto en el resultado de la media, diferenciando dos cuadrantes en la gráfica por una división vertical. La imagen 34b presenta la tendencia al aumento en la producción de toxina.

Para validar estadísticamente las observaciones arrojadas por las gráficas I Chart y Scatterplot, corremos un Test de Medias (Figura 35). Consideramos como Hipótesis Nula (H_0) que *Nada Cambió* y como Hipótesis Alternativa (H_a) que *El proceso se movió significativamente*. El resultado de este estudio nos muestra un p-Valor de 0,000. Si el p-Valor es menor que 0,05, se rechaza la H_0 , aceptando entonces la H_a , por lo que el cambio genera resultados positivos a nivel de producción de toxina, quedando así validado estadísticamente. Cabe aclarar que resultados de p-Valor iguales a 0,000 no significa que sea un valor nulo, significa que el valor después de la coma es tan pequeño que el software no puede registrarlo²⁴.

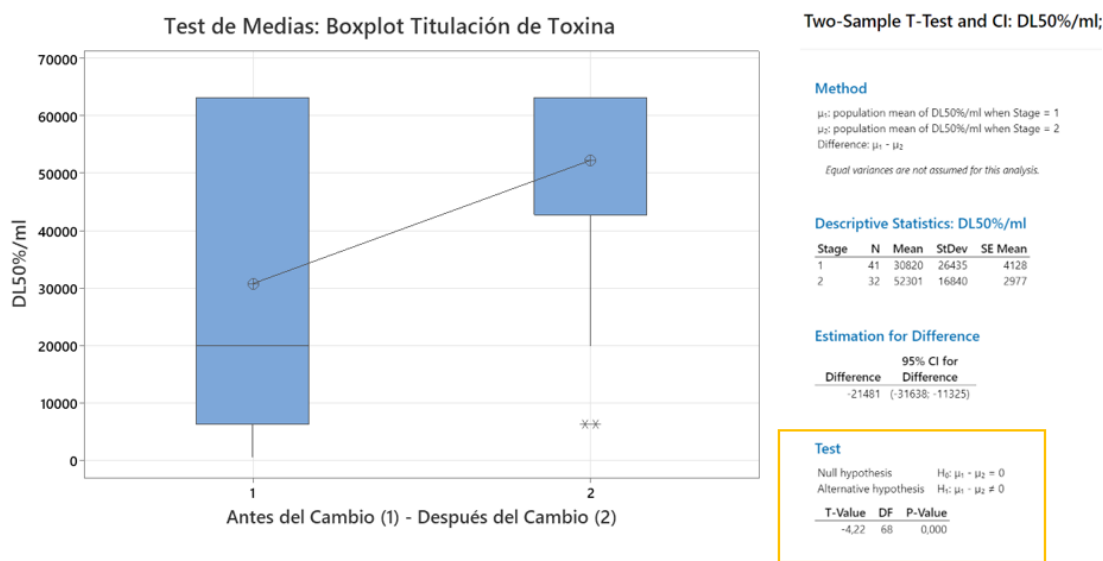
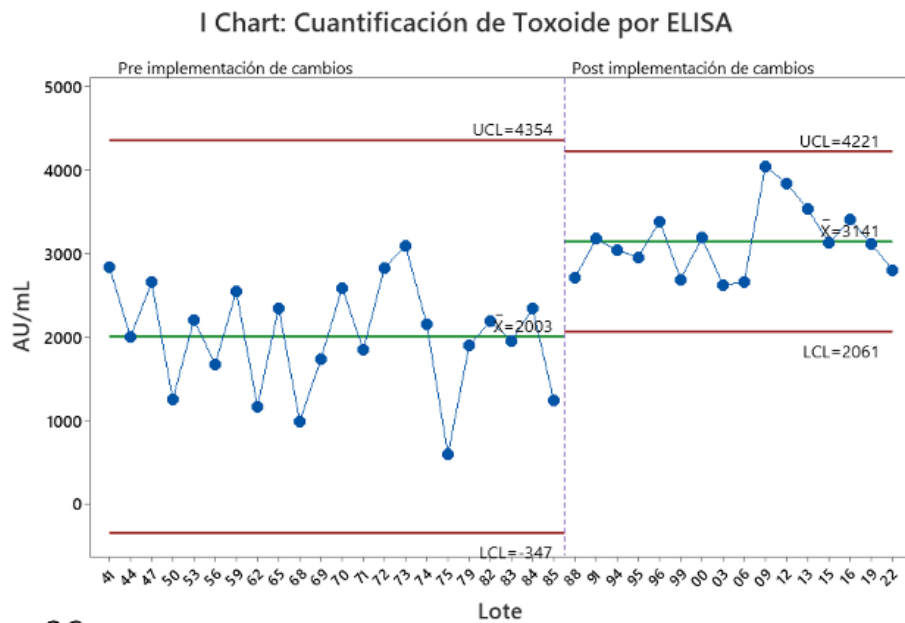
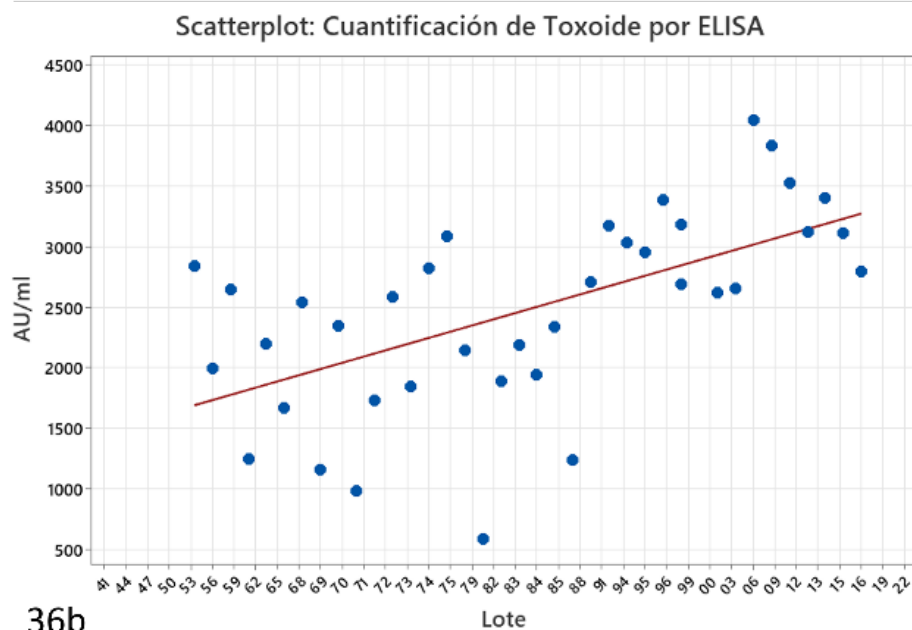


Fig. 35. Evaluación del impacto luego de aplicados los cambios propuestos a lotes industriales mediante Test de Medias en Minitab. Resultado: p-Valor = 0.000 confirma que el proceso se movió significativamente, se acepta el cambio como válido.

Si recordamos, otro de los parámetros con los que contábamos para evaluar los rendimientos del cultivo antes del cambio era la cuantificación de toxoide mediante test de ELISA. A su vez era uno de los parámetros que se identificaron como objetivo para mejorar, dado que, al aumentar los rendimientos de toxina, su consecuente toxoide también se vería aumentado. Nuevamente utilizando una gráfica de I Chart en Minitab vemos el incremento en los valores de ELISA expresados como AU/mL, donde la nueva media alcanza valores de 3141 AU/mL. Se incluye también una gráfica donde observamos como cambió la tendencia de forma incremental. (Figura 36)



36a



36b

Fig. 36. Evaluación del cambio mediante Control Chart en Minitab. 36a Se observa un gráfico de “antes y después” donde se monitorea la media de producción de toxoide por el Test de ELISA. 36b Gráfico Scatterplot que registra la tendencia a la suba en los sucesivos lotes.

Nuevamente para validar estadísticamente las observaciones arrojadas por las gráficas I Chart y Scatterplot, corremos un Test de Medias (Figura 37). Consideramos como Hipótesis Nula (H_0) que *Nada Cambió* y como Hipótesis Alternativa (H_a) que *El proceso se movió significativamente*, el resultado de este estudio nos muestra un p-Valor de 0,000. Lo cual al ser menor que 0,05 rechaza la H_0 y valida la H_a , concluyendo que el proceso se movió significativamente. Por lo tanto, la

cuantificación de Toxoide luego de introducidos los cambios es significativamente mayor que antes de la introducción de los cambios a nivel productivo.

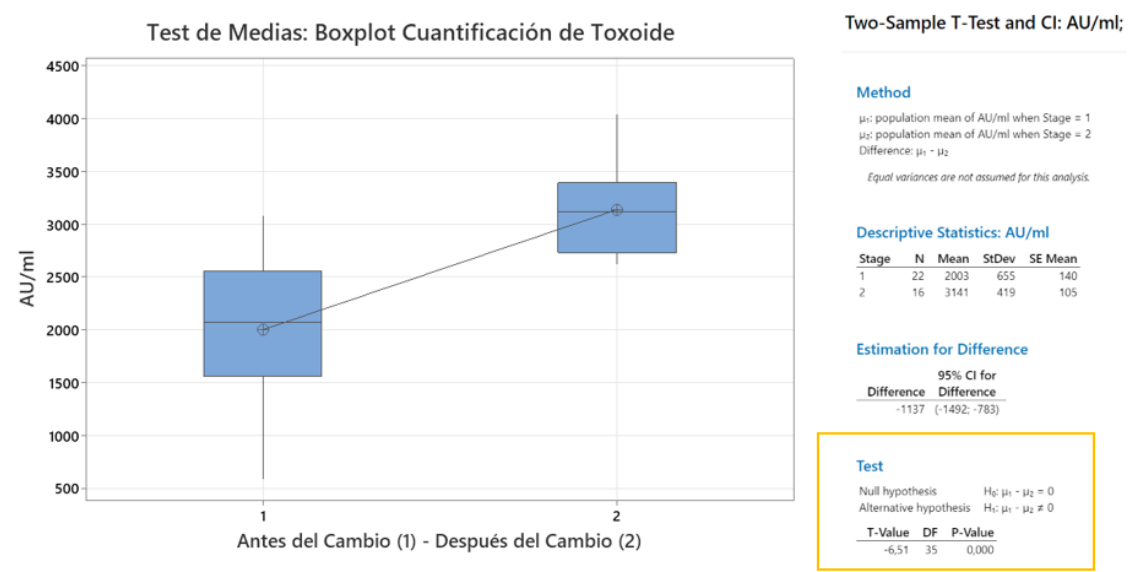


Fig. 37. Evaluación del impacto luego de aplicados los cambios propuestos a lotes industriales mediante Test de Medias en Minitab. Resultado: p-Valor = 0.000 confirma que el proceso se movió significativamente, se acepta el cambio como válido.

Uno de los parámetros más significativos a nivel de nuestra planta productiva es el impacto que esta producción de toxina, y su consecuente toxoide, tienen sobre las formulaciones experimentales, las cuales luego serán comercializadas.

Si recordamos al inicio de este trabajo se identificaba la tendencia a agregar cada vez más volumen de antígeno a las formulaciones para poder cumplir con los parámetros mínimos necesarios (Figura 5), lo que hablaba de una producción pobre de contenido antigénico por mL. Gracias al trabajo planteado, se observa ahora como se revirtió esta tendencia presentando un diagrama de “antes y después” (Figura 38a) donde claramente se observa que la media antes de los cambios era de 2,301 mL/dosis, mientras que hoy agregando 1,391 mL/dosis se cumple con la cantidad de UI necesarias por dosis para formular vacunas. En la gráfica también identificamos una zona que llamamos *Mix*, donde se formularon vacunas con mezclas de lotes anteriores al cambio junto con lotes producidos ya con la incorporación de los cambios, esto es porque si bien los lotes anteriores presentaban rendimientos menores, al haber sido aprobados deben ser consumidos. La gráfica Scatterplot marca claramente la tendencia a la baja en la cantidad de volumen agregado por dosis (Figura 38b). Esta reducción en el volumen representa un 40% menos de mililitros de antígeno por dosis.

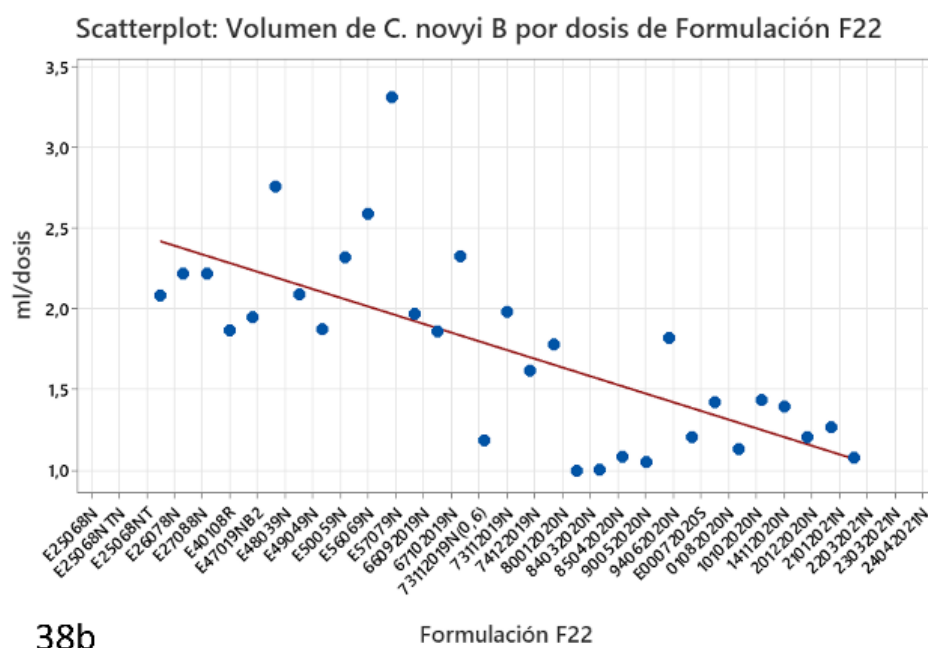
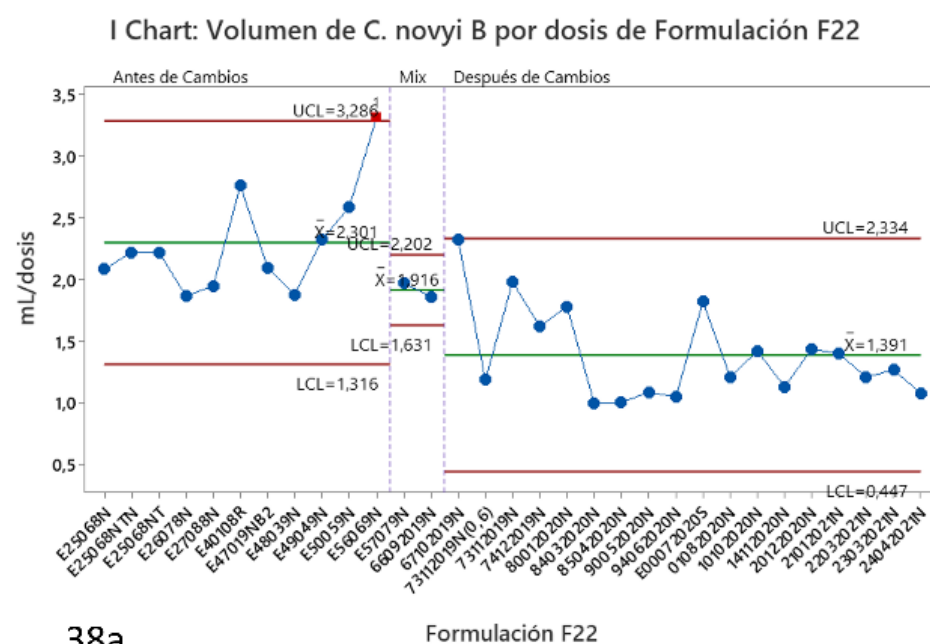


Fig. 38. Evaluación del cambio mediante Control Chart en Minitab. 38a Se observa un gráfico de “antes y después” donde se monitorea la media de volumen de antígeno agregado por formulación expresado en mL/dosis. **38b** Gráfica Scatterplot registra la tendencia a la baja en el volumen de antígeno necesario por dosis.

Para poder validar estas observaciones, corremos un Test de Medias (Figura 39), nuevamente consideramos como Hipótesis Nula (H_0) que *Nada Cambió* y como Hipótesis Alternativa (H_a) que *El proceso se movió significativamente*, el resultado de este estudio nos muestra un p-Valor de 0,000. Otra vez, en esta oportunidad el p-Valor es menor a 0,05, por lo que se acepta como valida la H_a , confirmando que los mililitros por dosis agregados son significativamente menores luego de

introducidos los cambios a nivel de producción de antígeno, contando con un antígeno de mejor calidad por mL producido.

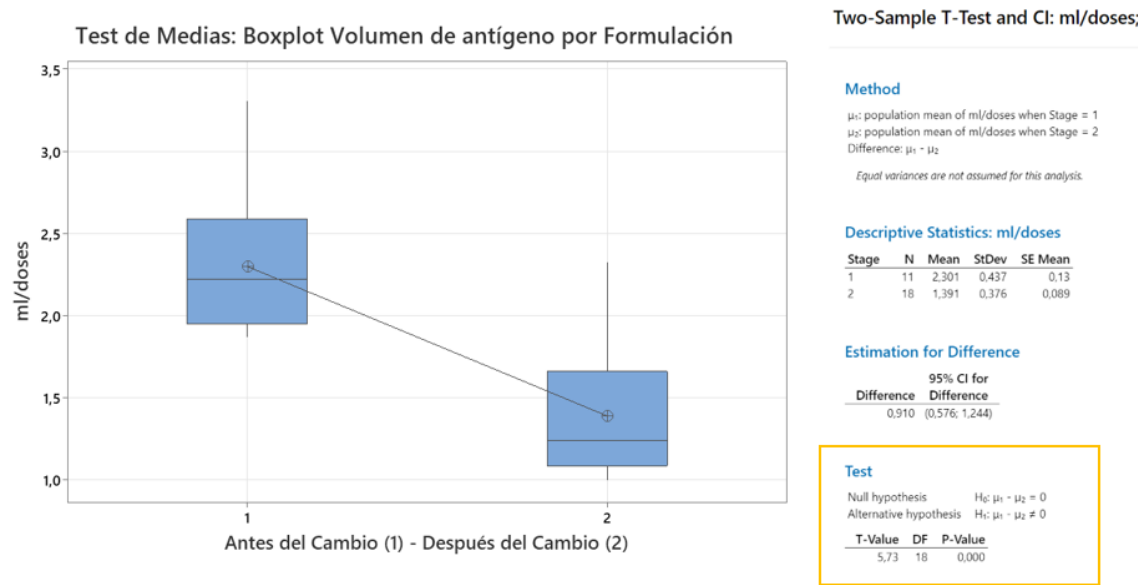


Fig. 39. Test de Medias en Minitab para verificar estadísticamente que el volumen agregado por dosis al momento de formular vacunas sea menor con antígenos producidos posteriormente al cambio. Resultado: p-Valor = 0.000 confirma que el proceso se movió significativamente, se acepta el cambio como válido.

Por último, dentro de los objetivos planteados, uno de los más importantes a nivel comercial es tener el 100% de efectividad en las vacunas formuladas. Antes del cambio propuesto, se registraba un 41% de rechazo en vacunas experimentales (Figura 6), vacunas que no llegaban a ser comercializadas, mientras que ahora formular vacunas con antígenos producidos posteriores al cambio muestran un 100% de aprobación, dado que todos los lotes de vacunas cumplen con el límite de aprobación de 3,5 UI/mL indicado por Farmacopea Europea⁷ (Figura 40).

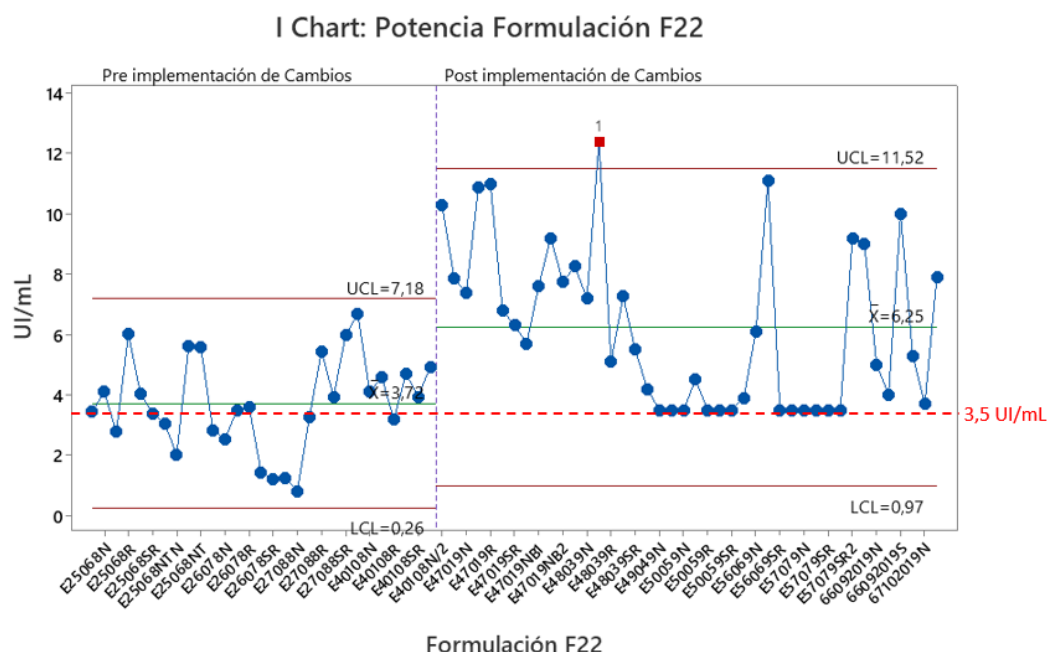


Fig. 40. Evaluación mediante Control Chart en Minitab, gráfico de “antes y después” donde se monitorean los resultados de potencia para *C. novyi B* de las Formulaciones F22 experimentales que luego serán comercializadas. Se identifica con línea punteada rojo el límite de aprobación en UI/mL de *C. novyi B* según indica Farmacopea Europea⁷.

Nuevamente corremos un Test de Medias para validar las observaciones presentadas a raíz de los resultados de la Figura 40, donde la Hipótesis Nula (H_0) sería que *Nada Cambió* y la Hipótesis Alternativa (H_a) es que *El proceso se movió significativamente*, el resultado de este estudio nos muestra un p-Valor de 0,000. Otra vez, en esta oportunidad el p-Valor es menor a 0,05 por lo que se acepta como válida la H_a , por lo que los nuevos lotes de formulaciones no solo cumplen con el límite de aprobación en un 100% de las formulaciones realizadas, si no que el cambio es estadísticamente válido (Figura 41).

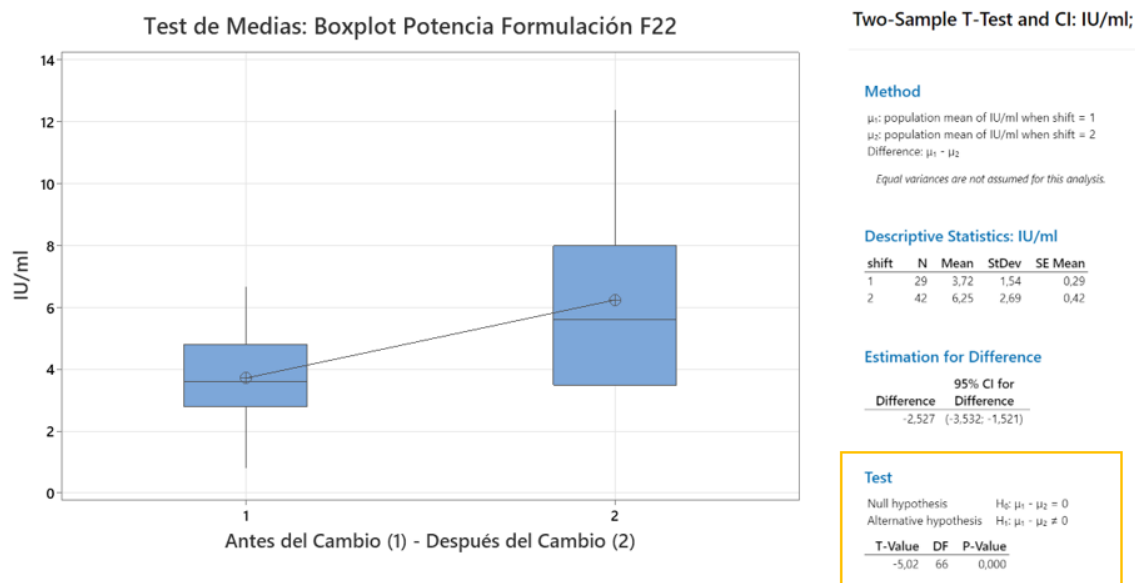


Fig. 41. Test de Medias en Minitab para verificar estadísticamente que el cambio genera 100% de aprobación en los lotes comercializados. Resultado: p-Valor = 0.000 confirma que el proceso se movió significativamente, se acepta como válido el cambio.

Dificultades enfrentadas:

desease considera importante comentar que el trabajo de investigación en planta industrial presenta desafíos adicionales a los enfrentados en un laboratorio de investigación. Esto es un desafío sobre todo a nivel de coordinación y toma de decisiones inmediatas.

A modo de ejemplo se destacan tres de las situaciones más críticas:

- El personal del Departamento de Producción tuvo que adicionar a su trabajo de rutina el seguimiento y la toma de muestras de más del doble de las consideradas en los procedimientos tradicionales documentados (IOPs = Instrucciones Operativas). A su vez, estas muestras debieron ser tratadas inmediatamente a ser colectadas (filtradas y conservadas en frío) para que no se generará un deterioro hasta su entrega para ser procesadas todas juntas. Hay que considerar que el personal está atendiendo a la vez varios cultivos industriales de diferentes antígenos, y con distintos procesos involucrados en cada uno.
- Durante el desarrollo de este trabajo en el Departamento de Producción se generó un cambio grande a nivel operativo, el cual fue la instalación de muestreo mediante sistema cerrado de todos los tanques fermentadores. Esto generó que lo que antes era abrir una válvula para tomar una muestra, ahora llevara una coordinación previa al momento de armar el tanque, dado que se tiene que adjuntar bolsas asépticas de muestreo para cada fracción que se decide tomar, esto no solo genera un costo adicional por muestra, reduciendo las posibilidades de monitoreo a números menores, si no que le quita versatilidad durante la investigación, ya que no se puede decidir sobre la marcha tomar una muestra si se evidencia algún comportamiento anómalo durante la fermentación.

- Con respecto a los tiempos de incubación, como se mencionó durante la presentación de los resultados, para poder modificar tiempos de cultivo con un fin de investigación, se necesita generar un Control de Cambios que asegure que el cambio involucrado no generara una baja en el rendimiento del cultivo, por ejemplo aumentar los tiempos de incubación, por lo que para estos casos fue preferible y más rápido tomar una muestra del cultivo y continuar con las pruebas a escala experimental en el laboratorio.

Teniendo esto en cuenta, también quiero mencionar que el trabajo a nivel industrial tiene un gran componente de trabajo en equipo, por lo que quiero destacar a su vez la buena disposición y profesionalismo del personal de Producción, lo cual aseguró la exitosa ejecución de este proyecto.

5. Conclusiones

Fue posible optimizar la producción de *Clostridium novyi* Tipo B mejorando consecuentemente los rendimientos de toxina y su toxoide derivado.

En primer lugar, se logró conocer el comportamiento de cada etapa de la semilla, logrando para cada pasaje un correcto punto de corte de incubación que asegure una posterior siembra con semilla en fase exponencial de crecimiento, esto, sobre todo a nivel industrial, mejoró los tiempos de incubación y redujo los tiempos de latencia en el crecimiento.

Las mejoras a nivel del cultivo industrial no se debieron únicamente al inóculo optimizado, también se mejoraron las condiciones de incubación como la desoxigenación del medio y la no modificación del pH durante la fermentación, permitiendo que el cultivo se desarrolle de manera natural gracias a un medio en condiciones anaerobias.

Mediante el desarrollo e implementación de las técnicas de inmunodifusión radial y cromatografía de inmunoafinidad, se logró conocer la cinética de producción de toxina dentro del tanque fermentador, optimizando el momento de detención de la incubación cuando la toxina está en su punto máximo de producción.

Todos estos cambios lograron un incremento del 70% en los niveles de toxina producida expresada como DL50%/mL, y su consecuente toxoide. Se logró reducir la carga de antígeno por dosis en la formulación principal de la planta (*Input antigénico* por F22) a < 2mL/dosis, lo que representa una reducción del 40%, y con un 100% de formulaciones aprobadas, por lo que el porcentaje de rechazo de vacunas experimentales bajo de 41% a 0%.

Estos cambios no solo son excelentes a nivel productivo, también a nivel de negocio tuvo un impacto importante. Por los buenos rendimientos del antígeno producido y considerando las necesidades comerciales, se estima un ahorro productivo de aproximadamente 13.600L de *C. novyi* B anuales, lo que equivale a liberar a nivel de planta el uso de un fermentador de 3000L por mes, permitiendo aumentar la capacidad productiva de otros clostridios necesarios. Y considerando la reducción de volumen a agregar por dosis por formulación F22, cada lote rinde ahora 1.5 veces, esto genera un ahorro de aproximadamente USD 69.000 por año.

6. Perspectivas

La mejora productiva de este clostridio puede ser utilizada como modelo para mejorar el resto de los cultivos de clostridios producidos en el sitio de MSD Montevideo, y mediante transferencia tecnológica, los producidos en los distintos sitios de MSD a nivel de la red global.

Como trabajo futuro se plantea la optimización de la técnica de cromatografía de inmutafinidad por FPLC para hacer seguimiento y definir el punto óptimo de fin de cultivo de otros de los clostridios producidos en el sitio MSD Montevideo. Se detalla abajo los antígenos para los que se encuentran disponibles columnas con anticuerpos monoclonales:

Anticuerpo monoclonal (mAb)	Especificidad	Isotipo
WEP82H12-INT	<i>C. perfringens</i> D-epsilon toxin	IgG2b
CP68-INT	<i>C. perfringens</i> B- beta toxin	IgG1
	<i>C. perfringens</i> C - beta toxin	

7. Referencias

1. Navarro, M. A. & Uzal, F. A. Pathobiology and diagnosis of clostridial hepatitis in animals. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **32**, 192–202 (2020).
2. Underwood, W. J. *et al. Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). Laboratory Animal Medicine: Third Edition* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8.
3. Henry R. Stämpfli , DVM, DrMedVet, DACVIM, U. of G. & Olimpo J. Oliver-Espinosa , DVM, MSc, DVSc, N. U. of C. Infectious Necrotic Hepatitis in Animals (Clostridium novyi Infection, Black Disease). *MSD and the MSD Veterinary Manual* 5.
4. Deborah, C. Enfermedades Clostridiales. *Rev. del Plan Agropecu.* **135**, 5 (2010).
5. LJ, R. & H, M. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**, 493–497 (1938).
6. T Malmfors, A. T. LD50 - its value for the pharmaceutical industry in safety evaluation of drugs. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **52 Suppl.**, 229–246 (1983).
7. European Pharmacopoeia 10.8. CLOSTRIDIUM NOVYI (TYPE B) VACCINE FOR VETERINARY USE Vaccinum Clostridii novyi B ad usum veterinarium. **10.8**, (2022).
8. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
9. CHEMICON International, I. RABBIT ANTI GOAT IgG (H & L) HORSERADISH PEROXIDASE CONJUGATED AFFINITY PURIFIED ANTIBODY. 5-30-2002/AP106P/CB **1**, 1.
10. Fornera, S. & Walde, P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. *Anal. Biochem.* **407**, 293–295 (2010).
11. European Pharmacopoeia. 2.7.1. Immunochemical Methods. *Eur. Pharmacopoeia* 20701–20702 (2005).
12. Grant, G. H. Principles of protein estimation by radial immunodiffusion. *J. Clin. Pathol.* **24**, 89–90 (1971).
13. WHO international Standard - Medicines & Healthcare products Regulatory Agency -NIBSC. *WHO Technical Report Clostridium novyi (Gas-Gangrene) Antitoxin Equine. 3rd International Standard.* (2013).
14. Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E., Sharma, S. & O’Kennedy, R. Immunoaffinity Chromatography: Concepts and Applications. *Dermot Walls Sinéad T. Loughran (eds.), Protein Chromatogr. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1485**, 27–51 (2017).
15. Cutler, P. Immunoaffinity chromatography. *Methods Mol. Biol. Protein Purif. Protoc.* **244**, 167–177 (2015).
16. Kandušer, M. & Ušaj, M. Cell electrofusion: Past and future perspectives for antibody production and cancer cell vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 1885–1898 (2014).
17. General Electrics Healthcare Bio-Sciences AB. HiTrap NHS-activated HP. *Dataf.* 18-1134-80 AC 1–4 (2006).
18. Madadlou, A., O’Sullivan, S. & Sheehan, D. Fast Protein Liquid Chromatography. *Dermot Walls Sinéad T. Loughran (eds.), Protein Chromatogr. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **681**, 439–447 (2011).

19. Healthcare, G. ÄKTA™ Laboratory-scale Chromatography Systems Handbooks from GE Healthcare Life Sciences. **3**, 153 (2016).
20. Cytiva. ÄKTA go. 1–8 (2020).
21. Monod, J. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol* 371–394 (1949) doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
22. Sánchez-Clemente, R., Guijo, M. I., Nogales, J. & Blasc, R. Carbon Source Influence on Extracellular pH Changes along Bacterial Cell-Growth. *Genes (Basel)*. **11**, 1–17 (2020).
23. Pérez-Etcheverry, D., Nieto-Cadenazzi, A. & Miraballes-Martínez, I. A new α -toxin monitoring method to optimize production efficiency in industrial cultures of *Clostridium novyi* B. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. **71**, 124–130 (2012).
24. Dahiru, T. P-Value, a true test of statistical significance? a cautionary note. *Ann. Ibadan Postgrad. Med.* **6**, 21–26 (2008).