

Revisión especial

Producción de formulaciones terapéuticas de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 purificadas a partir de plasma de pacientes convalescientes o equinos inmunizados con proteínas virales recombinantes.

Instituto Clodomiro Picado^{1*}.

¹ Instituto Clodomiro Picado. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica

*Los autores de la publicación (personal del Instituto Clodomiro Picado) comparten de forma colaborativa la autoría.

Autor correspondiente:

Dra Cecilia Oreiro, Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Correo: Cecilia.diaz@ucr.ac.cr

Resumen

Actualmente no existe un tratamiento aprobado para la infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, que causa la enfermedad conocida como COVID-19.

El Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica) y la Caja Costarricense del Seguro Social se plantearon recientemente la posibilidad de utilizar el potencial humano, así como la infraestructura y equipo con que se cuenta y que se ha utilizado en las últimas décadas para la producción de antivenenos, para afrontar la actual pandemia en términos de producir medicamentos inmunobiológicos para el tratamiento de pacientes con esta enfermedad.

Se acordó producir dos diferentes formulaciones de inmunoterapia pasiva para pacientes en estado avanzado de la enfermedad. La primera formulación consiste en una preparación de inmunoglobulinas humanas a partir del plasma de donadores que se recuperaron de la enfermedad (plasma convaleciente) y la segunda formulación es una preparación de anticuerpos heterólogos purificados a partir del plasma de caballos bajo un esquema de inmunización con varios antígenos virales recombinantes.

De esta forma, se espera que, en poco tiempo el país pueda contar con productos eficaces y seguros para el tratamiento de los pacientes en estado crítico debido a la infección por SARS-CoV-2 y que se encuentran hospitalizados en nuestro sistema de salud pública.

Palabras clave: coronavirus, SARS-CoV-2, anticuerpos, inmunoterapia, plasma convaleciente.

Abstract

Currently, there is no approved treatment for the infection with the new SARS-CoV-2 coronavirus, the infectious agent that causes the disease known as COVID-19.

Instituto Clodomiro Picado (University of Costa Rica) and the Costa Rican Social Security System (Caja Costarricense del Seguro Social) recently planned the possibility to utilize the human resources, as well as the infrastructure and equipment used during the last decades in the production of antivenoms, to confront the current pandemic, in terms of the production of immunobiologicals for the treatment of patients with this disease.

Two formulations of passive immunotherapy will be produced to treat patients in the advanced stages of the disease. The first one, a formulation of human immunoglobulins from patients who

have recovered from the disease (convalescent plasma), and the second, a formulation prepared from polyclonal antibodies purified from the plasma of horses which were immunized with several recombinant viral antigens.

In this way, our country could have in a short time, safe and effective immunobiologicals for the treatment of the patients in critical stages of the disease due to SARS-CoV-2 infection, hospitalized in our public health system.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, antibodies, immunotherapy, convalescent plasma.

Introducción

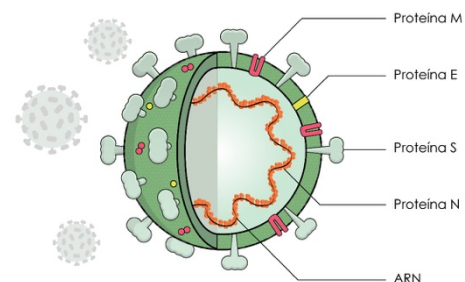
El SARS-CoV-2 es un coronavirus cuyo genoma consta de una sola banda de ARN en sentido positivo que codifica para algunas proteínas estructurales y otras no-estructurales. Dentro de las proteínas no-estructurales existen varias enzimas, las cuales se han considerado como sitios de posible tratamiento con agentes antivirales¹. La principal proteína de la envoltura es *spike* (proteína S), que es la molécula que inicia la infección viral a través de la interacción con receptores de la superficie celular, específicamente con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2)². En la envoltura, también están presentes dos proteínas pequeñas y no tan abundantes, la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E). Otra proteína importante es la nucleocápside (proteína N), que tiene funciones asociadas con la replicación y la transcripción del virus, así como con el empaquetamiento de su ARN (**Figura 1**). Todas estas moléculas son también consideradas como blancos de potenciales terapias, a través de la producción de anticuerpos específicos, algunos de los cuales podrían bloquear la entrada del virus en las células al inhibir la interacción con sus receptores³.

Actualmente no existe un tratamiento específico aprobado para la infección por el nuevo virus

SARS-CoV-2, el agente infeccioso que causa la enfermedad conocida como COVID-19. Por esta razón, el tratamiento actual de la enfermedad es básicamente de apoyo⁴. En teoría, el tratamiento exitoso de esta infección debería producir la

neutralización del virus, así como también, inducir una respuesta de citotoxicidad dependiente de anticuerpos, y la remoción de los agentes virales circulantes⁵.

Figura 1. Esquema de la estructura básica y proteínas más abundantes del virus SARS-CoV-2.



La infección por los virus SARS induce una respuesta inflamatoria en el organismo, la cual comienza con una respuesta inmune innata y la producción de citoquinas, tales como interferones, activando macrófagos y la maduración de células dendríticas. Posteriormente, se produce una respuesta adaptativa que cursa con la activación de células T CD4+ y CD8+ y la subsecuente estimulación de células B que producen anticuerpos contra el virus⁶. Por otro lado, las células CD8+ activadas causan la lisis de las células infectadas por el virus. En los pacientes que se recuperan, los anticuerpos están presentes en un período de alrededor de 10 a 15 días después de la infección y pueden durar mucho tiempo presentes en la sangre⁴.

La sintomatología de esta enfermedad incluye fiebre, tos y un cuadro severo de neumonía, pero las causas principales de muerte son el síndrome agudo de estrés respiratorio (ARDS, por sus

siglas en inglés), así como la falla orgánica múltiple resultante de un cuadro inflamatorio de carácter sistémico⁷.

De acuerdo con la experiencia desarrollada a partir del tratamiento de pacientes infectados con otros virus respiratorios humanos, se sabe que existen varias opciones de inmunoterapia pasiva con anticuerpos para combatir esas infecciones virales. Estas son: el uso de plasma de pacientes convalecientes o de anticuerpos purificados de ese plasma y el uso de anticuerpos monoclonales contra las proteínas del virus. Una opción mucho menos mencionada, pero también posible, es la de producir anticuerpos policlonales en animales tales como caballos u ovejas, a través de la inmunización con algunas proteínas virales. Este es un abordaje que se ha probado en el caso del virus H1N1⁸. También, se ha demostrado la capacidad neutralizante de anticuerpos equinos contra el virus SARS-CoV en un modelo de hamsters infectados^{9,10}. La proteína *spike*, responsable de la interacción con receptores y que resulta en la infección celular, ha sido la más utilizada para producir anticuerpos neutralizantes¹¹.

Las diferencias entre estas opciones terapéuticas potenciales podrían estar basadas en la relación eficacia/seguridad, principalmente debido al riesgo potencial de desarrollar reacciones adversas. Las preparaciones de inmunoglobulinas purificadas son una opción más segura y con mayor actividad que el plasma convaleciente, y al ser producidas por una combinación del plasma de varios pacientes, pueden aumentar la polivalencia de los anticuerpos contra el virus, lo que podría resultar en un mejor tratamiento para los pacientes en estado avanzado de la infección y con un cuadro clínico más severo¹².

En términos de la eficacia, el plasma convaleciente ya ha sido previamente usado para infecciones con otros coronavirus como SARS-CoV y MERS-CoV y, aunque no se encuentran disponibles ensayos clínicos controlados, los

meta-análisis sustentan su uso, comparado con la ausencia de terapia específica⁸.

Sin embargo, tanto en el caso de plasma convaleciente como en el de anticuerpos purificados, el riesgo de desarrollar enfermedades causadas por otros virus presentes en la sangre de los donadores es un factor que debe tomarse seriamente en consideración¹³, para garantizar los controles de seguridad correspondientes.

Por otro lado, en la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales, también existe el problema de los altos costos asociados y de que la selección de los posibles anticuerpos neutralizantes es un proceso que consume mucho tiempo, lo que retrasaría el acceso a un tratamiento rápido y eficaz¹³.

Es importante tomar en consideración también que, en algunos casos, en los tratamientos con inmunoterapia pasiva con anticuerpos, se han observado efectos adversos como un aumento significativo en la infección inducida por los anticuerpos y en una disminución en la respuesta inmune propia de los pacientes, siendo ambas condiciones contraproducentes en el tratamiento^{5,12, 14}. No obstante, los análisis efectuados hasta ahora indican que esta terapia basada en la inmunización pasiva con anticuerpos es promisorio, en el contexto de carencia de otras terapias específicas.

Compromisos adquiridos y en progreso en el Instituto Clodomiro Picado

El Instituto Clodomiro Picado (ICP), adscrito a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR), ha producido sueros antiofídicos durante varias décadas (este año cumple 50 años de existencia), con el objetivo de resolver el problema de los envenenamientos por mordeduras de serpientes, tanto para Costa Rica y otros países de Latinoamérica como para algunos países de África¹⁵.

Recientemente, y en colaboración con la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), se planteó la posibilidad de aprovechar la capacidad instalada que posee actualmente el ICP (tanto en

términos de potencial humano como de infraestructura y equipo), para dar un aporte con miras a enfrentar la actual pandemia y tratar de producir medicamentos biológicos para el tratamiento de pacientes con la enfermedad del COVID-19.

Específicamente, el compromiso adquirido radicaría en la producción de dos diferentes formulaciones para dar tratamiento de inmunoterapia pasiva a pacientes en estado avanzado de la enfermedad. Un producto consistiría en una preparación de inmunoglobulinas humanas a partir del plasma de donadores que se recuperaron de la enfermedad (plasma convaleciente) y el otro producto sería una preparación de anticuerpos heterólogos purificados a partir del plasma de caballos inmunizados con proteínas virales recombinantes (**Figura 2**).

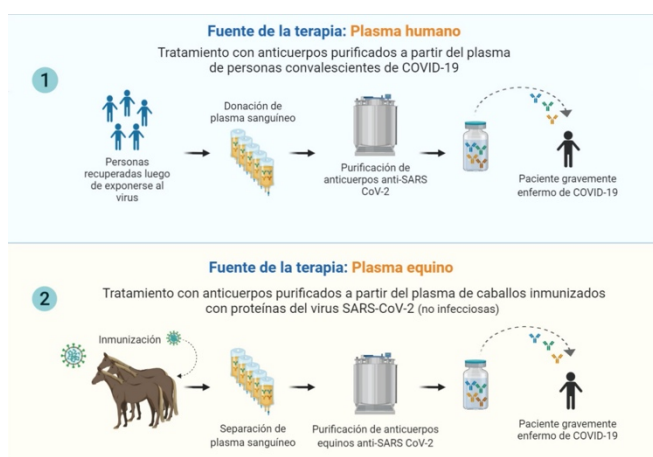


Figura 2. Estrategias de producción y purificación de formulaciones terapéuticas de inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 de origen humano y equino que se llevarán a cabo en el ICP.

Las preparaciones terapéuticas de anticuerpos, como cualquier producto farmacéutico, deben cumplir con criterios de pureza, seguridad y eficacia, deben producirse bajo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y, tanto su producción como su uso, deben tener los permisos correspondientes otorgados por el

Ministerio de Salud. Por ello, y antes de llevar a cabo los procesos con plasma de pacientes convalecientes, se han estado realizando pruebas con plasma humano normal, en términos de los procedimientos de purificación de las inmunoglobulinas, la esterilización del producto y otros análisis necesarios para determinar su seguridad como medicamento de administración intravenosa. Los procesos principales de purificación de los anticuerpos se han realizado en una planta piloto que posee el ICP y las pruebas preliminares de esterilización del producto, en el Centro de Investigación y Extensión en Materiales (CIEMTEC) de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Las pruebas de esterilidad se llevan a cabo en el Laboratorio de Análisis y Asesoría Farmacéutica (LAYAFA) del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR) y las de riesgo trombogénico, en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), ambos de la UCR. Varias empresas privadas aportarán también al proceso con algunas pruebas específicas no menos importantes.

Por otra parte, se requiere de la determinación de la potencia neutralizante y la cuantificación de la concentración de proteína total¹⁶, así como la caracterización del perfil de isotipos de anticuerpos que están presentes en el suero. Para esto último se cuenta con la colaboración del Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR, quien también se encargará del tamizaje previo del plasma de los donadores por la presencia de virus, entre los cuales se encuentran los de hepatitis B y C y HIV, entre otros.

Las características fisicoquímicas del producto final, así como la ausencia de proteínas contaminantes, son también aspectos importantes y deben controlarse para evidenciar la seguridad del medicamento¹⁷. La mayoría de estas pruebas son realizadas de rutina en el ICP para los antivenenos que se producen, sin embargo,

existen algunas diferencias en lo que respecta a la producción de este nuevo medicamento.

En el caso de la segunda estrategia que se llevará a cabo en el ICP, el primer punto a discutir fue la escogencia de los antígenos que se utilizarían, ya que existe mucha bibliografía asociada a la producción de vacunas y de anticuerpos monoclonales, pero principalmente referente a los coronavirus causantes de epidemias anteriores. La mayoría de los artículos se han enfocado en la utilización de la principal proteína que se encuentra expuesta en la superficie viral, la proteína *spike*¹⁷. Esta proteína es la molécula que interactúa con el principal receptor caracterizado hasta la fecha para este virus, que es la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), presente en la membrana de varios tipos celulares, entre ellos, las células que conforman el epitelio pulmonar¹⁹. Por otro lado, incluso se ha ido aún más lejos y se ha sugerido en que el mejor antígeno podría ser el dominio de esta proteína que interactúa con el receptor, conocida como RBD (*Receptor-binding domain*, por sus siglas en inglés)³. Existe bastante información sobre la producción de anticuerpos contra coronavirus que son neutralizantes de la sintomatología y de la infección, y que reconocen la proteína *spike*, pero estos estudios se han centrado principalmente en el caso de SARS-CoV, y no del nuevo virus SARS-Cov-2⁶.

Por otra parte, los pocos estudios serológicos existentes que caracterizan la respuesta de inmunoglobulinas contra SARS-CoV-2, muestran que los pacientes efectivamente desarrollan anticuerpos contra la proteína *spike*, pero también contra la proteína de la nucleocápside, una proteína muy abundante e inmunogénica que se encuentra dentro de la cápside viral²⁰. El virus también posee otras proteínas menos abundantes, algunas de las cuales también están expuestas en su superficie (Figura 1).

De esta forma la escogencia del antígeno para llevar a cabo la inmunización de los caballos es

un tema que requirió de una profunda valoración, en términos de la posibilidad de utilizar un esquema con solo un antígeno, o la combinación de varios, ya que esto podría determinar la generación o no de una respuesta inmunogénica en los animales, así como su capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos.

El procesamiento del plasma de los caballos inmunizados y la purificación de las inmunoglobulinas se llevará a cabo en la planta industrial del ICP siguiendo los mismos protocolos que se usan actualmente en la producción de antivenenos. Esta tecnología se basa en la purificación de las inmunoglobulinas mediante precipitación con ácido caprílico¹⁷.

La eficacia pre-clínica de antivenenos producidos en el ICP se realiza midiendo ciertas actividades biológicas del suero, pero el referente principal es su capacidad de inhibir o neutralizar la letalidad del veneno, en ratones. En el caso de las pruebas de neutralización de un virus, el efecto podría medirse de diferentes formas. Las más utilizadas son la determinación de la disminución de la carga viral, desaparición de los síntomas de la enfermedad o en último caso, el efecto sobre la mortalidad de los animales de experimentación infectados con el virus. Otra alternativa podría ser la neutralización del efecto citopático del virus en modelos de cultivo celular. Estas pruebas no se llevarán a cabo en el ICP sino en laboratorios que cuentan con las medidas de bioseguridad necesarias para hacer investigación con virus de ese nivel de peligrosidad. Se ha establecido contacto con varios de estos laboratorios para coordinar la ejecución de estas pruebas una vez que se generen las preparaciones de anticuerpos en el ICP. Este tipo de evaluación de la actividad de neutralización viral es válida, tanto para las preparaciones de anticuerpos de origen humano, como de origen equino. Por otro lado, antes de realizar las pruebas preclínicas de neutralización en animales debe medirse la presencia, en el producto, de anticuerpos específicos contra las proteínas virales con las que los animales fueron

inmunizados y sus títulos respectivos. Esto se realizará en el instituto a través de la utilización de pruebas inmunoenzimáticas.

De esta forma, a través de estas dos diferentes estrategias, se espera que, en unas pocas semanas (en el caso de las inmunoglobulinas humanas), o meses (en el caso de los anticuerpos equinos), el país pueda contar con productos eficaces y seguros para el tratamiento de los pacientes en estado crítico debido a la infección por SARS-CoV-2 y que se encuentran en los hospitales de la CCSS.

La posibilidad de desarrollar un proyecto de este nivel e impacto se basa, por un lado, en la existencia de una base científico-tecnológica endógena, generada a través de décadas de esfuerzo sostenido en el ICP y la UCR, la cual permite adaptar esta plataforma de producción industrial de preparaciones de anticuerpos a este nuevo reto sanitario mundial. Por otra parte, este proyecto se fundamenta en una alianza estratégica que se ha consolidado a través de décadas entre la CCSS y la UCR, la cual permitirá enfrentar este enorme reto como país. El contar con instituciones públicas de seguridad social y de educación superior sólidas le abre al país la posibilidad de generar respuestas oportunas frente a esta pandemia.

Créditos

Ninguno.

Conflictos de interés

Ninguno de los autores declara conflictos de interés.

Fuentes de financiamiento

Ninguna fuente de financiamiento a declarar.

Referencias

- Li, G., DeClercq, E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nature Rev Drug Discov* 2020;19:149-50
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020 Epub ahead of print: doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5
- Ju, B., Zhang, Q., Ge, X, et al. Potent human neutralizing antibodies elicited 1 by SARS-CoV-2 infection. *BioRxiv* 2020. Epub ahead of print: doi.org/10.1101/2020.03.21.990770
- Tiberghien, P., de Lamballerie, X., Morel, P., et al. Collecting and evaluating convalescent plasma for COVID-19 treatment: why and how. *Vox Sang* 2020 Epub ahead of print doi: 10.1111/vox.12926
- Casadevall, A., Pirofski, L-A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J Clin Invest* 2020. Epub ahead of print doi.org/10.1172/JCI138003
- Yi, Y., Lagniton PNP, Ye, S, et al. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci* 2020;16:1753-1766
- Shetty, R. Ghosh, A., Honavar, S.G., et al. Therapeutic opportunities to manage COVID-19/SARS-CoV-2 infection: Present and future. *Indian J Ophthalmol* 2020. Epub ahead of print doi: 14.4103/ijo.IJ0_639
- Mair-Jenkins, J., Saavedra-Campos, M., Baillie, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis* 2005;211: 80-90.
- Zhao, G., Ni, B., Jiang, H, et al. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection by Equine Neutralizing Antibody in Golden Syrian Hamsters. *Viral Immunology*. 2007;20:197-205.
- Luo, D., Ni, B., Zhao, G., et al. Protection from Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in a Chinese Hamster Model by Equine Neutralizing F(ab)₂. *Viral Immunology*. 2007;20:495-502.
- Wang, C., Li, W., Drabek, D., et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *BioRxiv* 2020 Epub ahead of print doi.org/10.1101/2020.03.11.987958
- Focosi, D., Anderson, A.O., Tang J.W, Tuccori M.. Convalescent plasma therapy for COVID-19: State of the Art. *Preprints* 2020. Epub ahead of print doi:10.20944/preprints202004.0097.v1
- AminJafaria, A., Ghasemib, S. The possible of immunotherapy for COVID-19: A systematic review. *Int Immunopharmacol* 2020 Epub ahead of print doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106455
- Iwasaki, A., Yang. Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020. Epub ahead of print doi.org/10.1038/s41577-020-0321-6
- Gutiérrez, J.M. 2018. La atención al problema de los envenenamientos por mordeduras de serpientes en Costa Rica: un proyecto nacional con proyección global. En: Gutiérrez, J.M. Reflexiones desde la

- academia. Universidad, ciencia y sociedad. Editorial Arlekin, San José, pp. 345-385.
16. Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., et al, Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* 2012;41:93-97.
 17. León, G., Vargas, M., Segura, A., et al.. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon* 2018;151:63-73.
 18. Ahmed, S.F., Quadeer, A.A., McKay, M.R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses* 2020;12:254.
 19. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367:1260-1263.
 20. Tilocca, B., Soggiu, A., Sanguinetti, M., et al. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. *Microbes Infect* 2020. Epub ahead of print doi.org/10.1016/j.micinf.2020.04.002