

Evaluación de la eficacia clínica de dos formulaciones terapéuticas de anticuerpos equinos contra el SARS-CoV-2 y optimización de la producción mediante la expresión de proteínas virales recombinantes como proteínas de fusión con el Fc de la IgG4 equina

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Resumen

Gracias al trabajo realizado durante los tres meses anteriores el Instituto Clodomiro Picado está a punto de culminar la producción de dos formulaciones terapéuticas de anticuerpos equinos contra el SARS-CoV-2. Estas preparaciones se obtuvieron a partir del plasma de animales que fueron inmunizados con proteínas virales recombinantes. Un primer grupo fue inmunizado con la proteína S (Spike) del virus y el segundo grupo inmunizado con una mezcla de las proteínas S1 (Spike), la proteína N (Nucleoproteína) y un constructo con epitopos de las proteínas S1, E (Envelope) y M (Membrana). Los recursos solicitados en este proyecto se utilizarán en el transcurso de los próximos 12 meses para (1) realizar la evaluación de la eficiencia clínica de los dos formulaciones terapéuticas en pacientes adultos hospitalizados (2) optimizar la producción de la formulación que tenga un mejor desempeño mediante la expresión de proteínas virales recombinantes como proteínas de fusión con el Fc de la IgG4 equina.

Antecedentes y actividades a realizar

El Instituto Clodomiro Picado (ICP), de la Universidad de Costa Rica, se dedica al estudio y búsqueda de soluciones al problema de los envenenamientos por mordeduras de serpiente, así como a la distribución de antivenenos para el tratamiento de envenenamientos por mordedura de serpiente. Durante cinco décadas, ICP ha realizado importantes contribuciones a la comprensión de los venenos y envenenamientos por mordeduras de serpientes y al desarrollo de tecnologías para la producción de antivenenos (Gutiérrez et al., 2005; Vargas et al., 2011; Villalta et al., 2016; León et al., 2018). Estos productos se generan en caballos inmunizados con venenos de serpiente. Los caballos son sangrados y los anticuerpos producidos por el sistema inmune de los caballos se purifican y se usan para el tratamiento de las mordeduras de serpiente. El ICP distribuye antivenenos no solo a Costa Rica, sino también al resto de América Central, a algunos países de América del Sur y a varios países del África subsahariana, donde existe una grave deficiencia en el suministro de antiveneno. Cada año, ICP produce y distribuye 100.000 viales de antivenenos, que representan el tratamiento de entre 15.000 y 20.000 personas que sufren mordeduras de serpientes en varias regiones del mundo.

El ICP es un centro de referencia en el mundo en materia de envenenamientos por mordeduras de serpientes, y producción y control de calidad de antivenenos. En el ámbito académico, los investigadores del ICP han publicado más de 800 artículos científicos en revistas internacionales y han recibido varios premios nacionales e internacionales.

Aprovechando los conocimientos y la amplia experiencia que el ICP ha adquirido durante cinco décadas en la fabricación de estos productos terapéuticos, durante la crisis sanitaria creada por la pandemia de COVID-19, el ICP inició el desarrollo de una nueva terapia para el tratamiento de casos severos y críticos de COVID-19. Esta terapia se basa en anticuerpos generados por caballos contra el virus, utilizando la misma lógica y tecnología que se ha utilizado para la producción de antiveneno, con la única diferencia de que en este caso los caballos fueron inmunizados con proteínas recombinantes del virus SARS Cov-2, como por ejemplo la proteína S1. Esta es la proteína que forma

las espículas del virus, mediante las cuales este microorganismo se une a sus receptores en las células, permitiendo la infección (Wrapp et al., 2020).

Un primer grupo de caballos fue inmunizado con la proteína S (Spike) del virus y el segundo grupo inmunizado con una mezcla de las proteínas S1 (Spike), la proteína N (Nucleoproteína) y un constructo con epitopos de las proteínas S1, E (Envelope) y M (Membrana). Las proteínas virales recombinantes se inyectaron repetidamente en caballos durante 3 meses. El sistema inmune de los caballos generó anticuerpos contra dichas proteínas. Después del período de inmunización, se sangraron a los caballos, se separaron los componentes sanguíneos y se purificaron los anticuerpos usando la misma metodología utilizada para la producción de antiveneno. Esto permitió producir un producto farmacéutico rico en anticuerpos con la capacidad de unirse y neutralizar el virus, lo que permitiría reducir significativamente la gravedad de la enfermedad en pacientes hospitalizadas que sufren infección por SARS Cov-2. Es relevante señalar que la salud de los caballos no se ha visto afectada por este esquema de inmunización porque solo recibieron proteínas purificadas del virus, que no son tóxicas por sí solas.

El hecho de que un producto similar (es decir, antiveneno) se haya utilizado durante décadas en el tratamiento de los envenenamientos por mordedura de serpiente, con un excelente historial de eficacia y seguridad, asegura que este nuevo producto sea probablemente efectivo y seguro en el tratamiento de COVID-19. Esta hipótesis está respaldada por las observaciones clínicas de que los anticuerpos del plasma de pacientes convalecientes después de la infección por SARS Cov-2 están teniendo éxito en el tratamiento de esta enfermedad (Shen et al., 2020). La única diferencia aquí es que los anticuerpos que se generarán en este proyecto son de origen equino, pero la prueba del concepto de la eficacia de las terapias basadas en anticuerpos es clara. Además, se ha demostrado recientemente que es factible generar anticuerpos de caballo contra el dominio RBD de la proteína S del virus SARS Cov-2, y se ha demostrado que este producto equino es eficaz en la neutralización del virus (Pan et al., 2020); desarrollos similares se habían realizado anteriormente con anticuerpos contra el SARS Cov-1 (Lu et al., 2005). Por lo tanto, existe evidencia sólida en apoyo de la justificación propuesta en este proyecto.

Para desarrollar este proyecto, se han empleado la infraestructura y algunos de los equipos (estimados en más de 2 millones de dólares) actualmente en uso en el ICP para la producción de antiveneno, pero es necesario adquirir algunos reactivos requeridos para realizar la evaluación clínica de los dos productos obtenidos. Como se trata de un nuevo producto terapéutico, el protocolo clínico para su uso en humanos será aprobado por el comité ético científico central de la CCSS. Dado que los antivenenos derivados de equinos se usan regularmente en el tratamiento de las mordeduras de serpientes, y dado que este producto de anticuerpo anti-SARS Cov-2 tendrá características fisicoquímicas idénticas de estos antivenenos, los datos anteriores sobre la seguridad de estos productos se presentarán al comité de ética como evidencia. El diseño del ensayo clínico con este nuevo producto incluirá criterios de eficacia y también de seguridad, y esto se coordinará estrechamente con las autoridades sanitarias de Costa Rica y contará con la participación de un equipo de investigación clínica de la CCSS. Los pacientes serán evaluados desde el punto de vista clínico (síntomas y signos), de laboratorio general (hemograma, carga viral en aspirado nasofaríngeo, nivel sanguíneo de IL-6, IL-1beta, TNF, IFN-gamma, IL-17, IL-10, IL-38, IL-2, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1alfa, MIP-1beta) y por imágenes radiológicas de tórax. Los datos serán colectados antes del tratamiento (punto inicial), 24, 48, 72 h y luego cada 48h hasta su egreso después de completar el tratamiento según el esquema de evaluación del protocolo y serán los mismos para los dos grupos. El

fin del estudio para cada participante será su egreso del hospital. El estudio concluirá una vez que se cierre la base de datos y que el último paciente enrolado sea egresado del hospital.

Por otra parte también se requieren los insumos necesarios y algunos equipos más para optimizar la línea de producción del producto que muestre un mejor desempeño en los ensayos clínicos. Se propone que se utilicen seis caballos en este proceso de optimización optimizando la inmunogenicidad de las proteínas virales mediante ingeniería genética, para lo cual se expresarán como proteínas recombinantes con el dominio Fc de la inmunoglobulina G IgG4 equina, con el objetivo de aumentar la respuesta inmune de los animales inmunizados y tener un mejor rendimiento. Los caballos utilizados para la optimización de este proceso se ubicarán en la granja que el ICP tiene para mantener los caballos utilizados en la producción de antivenenos, y también se usarán parte de los recursos solicitados para la manutención de esos caballos.

La metodología para generar este producto basado en anticuerpos y los resultados del uso de esta novedosa terapia se comunicarán internacionalmente, de modo que otros centros de fabricación de antiveneno podrían usar esta tecnología en la preparación de anticuerpos equinos anti-SARS-Cov-2. Esto va de acuerdo con la propuesta del gobierno de Costa Rica de que el conocimiento que es útil para combatir esta crisis debe estar abiertamente disponible a través de repositorios públicos (<https://www.presidencia.go.cr/comunicados/2020/03/costa-rica-submits-proposal-for-who-to-facilitate-access-to-technologies-to-combat-covid-19/>). Se espera que esta capacidad ya establecida para producir antivenenos en muchos países se pueda adaptar para generar anticuerpos anti-SARS Cov-2 en muchos entornos, contribuyendo así a la disponibilidad de este fármaco que puede salvar vidas en otras regiones y continentes, a tono con la filosofía del ICP-UCR y con la del gobierno de Costa Rica. Dado que el ICP ya es un laboratorio de manufactura, tiene todo el potencial para avanzar este proyecto a una mayor escala de producción. Actualmente, el ICP fabrica 100,000 viales de antiveneno por año. Esta capacidad de producción puede usarse para generar mayores volúmenes de los anticuerpos anti-SARS Cov-2 en el futuro.

Referencias

1. Gutiérrez J.M., Rojas E., Quesada L., León G., Nuñez J., et al. 2005. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: An alternative to the antivenom crisis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99, 468-475.
2. León, G., Vargas, M., Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., et al. 2018. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon* 151, 63-73.
3. Lu et al. (2005) Preparation and development of equine hyperimmune globulin F(ab')₂ against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Acta Pharmacol. Sinica* 26: 1479-1484.
4. Pan, X., Zhou, P., Fan, T., Wu, Y., Zhang, J., et al. 2020. Immunoglobulin fragment F(ab')₂ against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 in vitro. *BioRxiv preprint* <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029884>.
5. Shen, C., Wang, A., Zhao, F., Yang, Y., Li, J., et al. 2020. Treatment of 5 critically ill patients with Covid-19 with convalescent plasma. *JAMA* . doi: 10.1001/jama.2020.4783.
6. Vargas M., Segura A., Herrera M., Villalta M., Estrada R., et al. 2011. Preclinical evaluation of a caprylic acid fractionated whole IgG antivenom for the treatment of envenomings by *Oxyuranus scutellatus canni* in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5): e1144.

7. Villalta, M., Sánchez, A., Herrera, M., Vargas, M., Segura, Á., et al. 2016. Development of a new polyspecific antivenom for snakebite envenoming in Sri Lanka: Analysis of its preclinical efficacy as compared to a currently available antivenom. *Toxicon* 122, 152-159.
8. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S., Goldsmith, J.A., Hsieh, C-L., et al., 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367: 1260-1263.

Recursos requeridos

Para el desarrollo de este proyecto se solicita financiamiento para la compra de reactivos de laboratorio requeridos para la evaluación clínica de las dos preparaciones de anticuerpos desarrolladas, cubrir los costos del clonaje y expresión de las proteínas virales recombinantes como proteínas de fusión con el dominio Fc de la inmunoglobulina G IgG4 equina, los costos de la manutención por un año de los caballos requeridos para la inmunización con las proteínas modificadas y la optimización del proceso de producción, los costos de las pruebas de neutralización en células en cultivo y en animales de experimentación requeridos durante la optimización y algunos equipos que junto con la infraestructura actual y las instalaciones del ICP, permitirán optimizar la producción de este nuevo medicamento para tratar a pacientes con COVID-19.

- (1) Recursos para los estudios clínicos: compra de los kits requeridos para la determinación de carga viral en las muestras de los pacientes tratados, así como para la determinación de los niveles sanguíneos de citoquinas proinflamatorias y los niveles de anticuerpos contra el virus mediante técnica inmunoenzimáticas (US \$ 80.000)
- (2) Costos del clonaje y expresión de las proteínas virales recombinantes como proteínas de fusión con el dominio Fc de la inmunoglobulina G IgG4 equina (US \$ 80.000)
- (3) Costos asociados a la manutención y el cuidado por un año de los seis caballos requeridos para la inmunización con las proteínas modificadas y la optimización del proceso de producción (US \$ 25.000)
- (4) Costo de las pruebas de neutralización viral en células en cultivo y en un modelo experimental de la infección. Esta prueba es necesaria para monitorear la capacidad de la preparación de anticuerpos para neutralizar el virus durante la fase de optimización y debe llevarse a cabo fuera del país ya que no contamos con laboratorios de bioseguridad que permitan cultivar el virus. (US \$100.000)
- (5) Consumibles para ser utilizados en la optimización de la purificación los anticuerpos: Estos consumibles incluyen (a) ácido caprílico y otros reactivos para el fraccionamiento del plasma; (b) medios cromatográficos y filtros desechables para la purificación de las inmunoglobulinas; (c) reactivos para caracterizar la respuesta de anticuerpos en los caballos (US \$75.000)
- (6) Equipos necesarios para la optimización del proceso de purificación los anticuerpos, incluyendo: equipo para medir la integridad de membranas, cuatro carcasas de filtros en profundidad, un equipo de diafiltración y un emulsificador (US \$140.000)