



VALIDACION DE LA PRODUCCION DE NECROTOXINAS RECOMBINANTES DE *Loxocles boneti*, *Loxocles laeta* y *Loxocles reclusa*.

^{1,2} Soria O. R., ¹ Vázquez H., ³ Alagón A., ^{1,2} Paniagua J. F. 1 Laboratorios Silanes Amores 1304 Col. Del Valle, C.P. 03100 México D.F. 2 Instituto Bioclon S.A. de C.V. Calz. Tlalpan 4687 Col. Toriello Guerra C.P. 04970 México D.F. 3 Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, C.P. 62210 Cuernavaca Morelos, México.

Recombinantes, Necrotoxinas, Loxosceles.

Introducción. La mordedura generada por arañas del género *Loxosceles* se conoce como *Loxoscelismo*, y generalmente producen lesiones necróticas en la zona de la mordedura, aunque se han reportado efectos sistémicos con síntomas como hemólisis, coagulación intravascular diseminada, hemoglobinuria e insuficiencia renal aguda. El *Loxoscelismo* puede presentarse bajo dos formas clínicas: *Loxoscelismo* cutáneo (LC) en el 84 a 90% de los casos y, la más grave, el *Loxoscelismo* viscerocutáneo (LCV) o sistémico en el 10 a 16% restante. La Esfingomielinasa D (SMD) es el componente tóxico principal del veneno de las arañas del género *Loxosceles*, aproximadamente 50% de la composición total del veneno. La SMD tiene un peso molecular de aproximadamente 33KDa a 35KDa y cataliza la ruptura de la esfingomielina en 1-fosfoceramida y colina. (1) Se han descrito diversos tratamientos como la dapsona, ácido acetilsalicílico, antibióticos (eritromicina y cefalosporina) y antivenenos de origen equino (2), siendo estos últimos los más eficaces en el tratamiento del *Loxoscelismo* viscerocutáneo. Actualmente, los antígenos utilizados para la producción de un antiveneno son los venenos nativos, estos deben ser de buena calidad, en promedio de arañas requeridas para producción dichos insumos es de alrededor de 5000 arañas/lote de inmunización, por ello su producción es limitada; el uso de las toxinas recombinantes puede cambiar radicalmente este panorama, puesto que se pueden producir semanalmente cantidades de toxinas equivalentes a 1000 ejemplares; esta ventaja no sólo se refleja en la cantidad de veneno producido, también se puede reflejar en los costos de producción, control de calidad y sobretodo en la disponibilidad independiente a los hábitos ecológicos y a la distribución de las especies. Se han generado y caracterizado cuatro isóformas de toxinas recombinantes de tres especies de arañas *Loxosceles*, las cuales han demostrado presentar amplias ventajas frente a las toxinas naturales, se ha evaluado la capacidad de reproducir los efectos del veneno nativo en conejos, inyectados por vía intradérmica (3). Además de tener la capacidad de inducir la producción de anticuerpos que neutralizan de manera análoga con los anticuerpos producidos por los venenos nativos. La utilización de proteínas recombinantes para uso humano o como insumo para la producción de otros biológicos debe cumplir con los lineamientos establecidos por las diferentes agencias regulatorias nacionales e internacionales entre las que destaca la Food and Drug Administration (FDA), la cual establece los requerimientos para asegurar la identidad, potencia, calidad y pureza del producto a través de un proceso controlado y consistente (4).

Objetivo. Validar la producción de necrotoxinas recombinantes de *Loxocles boneti*, *Loxocles laeta* y *Loxocles reclusa* para la obtención de un fáboterápico antiloxoscelico, en base a los requerimientos de la FDA.

Metodología. La validación consiste en 3 etapas:

1. **Expansión de banco celular maestro y banco celular de trabajo** para confirmar la identidad, pureza y compatibilidad de los bancos celulares durante el proceso de producción y almacenamiento.
2. **Producción; expansión del organismo recombinante y expresión de la toxina** para controlar y monitorear el proceso de producción para prevenir la contaminación, durante el crecimiento y expresión de la toxina.
3. **Cosecha y purificación de la toxina** para asegurar la reproducibilidad en el recobro de producto durante la cosecha y la consistencia de los requerimientos de calidad.

Resultados y discusión. Hasta el momento se ha logrado producir las cuatro toxinas recombinantes las mismas que han generado buenos resultados tanto en la actividad biológica así como altos rendimientos en la etapa de producción y purificación (cuadro No. 1) con ellas se han generado los primeros lotes piloto de fáboterápico antiloxocélico Loxmyn®.

Cuadro No. 1 Rendimiento de toxinas recombinantes.

Lote	Rendimiento mg/L	Actividad SMD
rLb Tx HVL 2006-001-001	30.16	146.45 U
rLr Tx HVL 2006-001-001	32.44	226.90 U
rLi Tx COOH HVL 2004-004	5.74	105.70 U
rLi Tx NH2 HVL 2004-008	66.00	229.52 U

Conclusiones. La evaluación y análisis que determino la efectividad del uso de toxinas recombinantes para la producción de un fáboterápico antiloxocélico a generado la necesidad de validar el proceso de producción para cumplir con los requerimientos regulatorios para lograr el registro y su comercialización.

Bibliografía.

1. Ramos, R.H. & I.R. Vázquez. 2000, **Aracnismo ocasionado por especies del genero *Loxosceles*, dentro del apartado de Urgencias Medico-Quirúrgicas**. Revista educativa para la Salud.
2. De Root, A. R., Salomón, OD, Lloveras, C.S. and A. T. Orduña 2002. **Envenenamiento por arenas del genero *Loxosceles***. Artículo Especial, Medicina Buenos Aires 62: 82-85.
3. Ramos- Cerrillo. B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A. & R. Stock. 2004 **Genetic an enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa***. Toxicon 44: 507-514.
4. **U.S. Food and Drug Administration, 1996, Guidance for Industry: For the Submission of Chemistry, Manufacturing and control Information for a Therapeutic Recombinant DNA-Derived Product or a Monoclonal Antibody Product for in vivo use**. U.S. FDA Rockville.