



Estudio de estabilidad acelerada del ingrediente farmacéutico activo Bm86/pP0 por el método de arrhenius

Accelerated stability study of the active pharmaceutical ingredient Bm86/pP0 by arrhenius method

Omar Díaz González ¹, Roxana Barrios Taura ¹, Rutdali María Segura Silva ¹, Laritza Caridad Domínguez Rabilero ¹, Amaury Pérez Sánchez ^{2,*}

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Área de Desarrollo Tecnológico, Camagüey, Cuba.

² Universidad de Camagüey, Facultad de Ciencias Aplicadas, Camagüey, Cuba.

*amaury.perez84@gmail.com

(recibido/received: 02-septiembre-2022; aceptado/accepted: 10-enero-2023)

RESUMEN

El estudio de estabilidad de proteínas es un proceso indispensable en la actualidad para el desarrollo de productos vacunales que contienen a éstas como principio activo. El presente trabajo se realizó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en el cual actualmente en el área de Desarrollo Tecnológico se trabaja en el diseño de una vacuna contra las garrapatas. El objetivo de este trabajo consistió en determinar el tiempo de inactivación de la proteína Bm86 portadora del péptido P0, aplicando para ello estudios acelerados de estrés térmico con el fin de predecir la estabilidad de la vacuna contra las garrapatas, tomando como base la ecuación de Arrhenius. Se realizaron además diferentes estudios para analizar las posibles vías de inactivación de la proteína Bm86. Los resultados obtenidos indicaron que a una temperatura de almacenamiento entre 2 °C y 8 °C la proteína, como ingrediente farmacéutico activo, posee un tiempo de duración predictivo de aproximadamente 2,5 años antes que se inactive un 10 % de la misma.

Palabras claves: Ecuación de Arrhenius; Estabilidad acelerada; Proteína Bm86; Temperatura; Tiempo de duración.

ABSTRACT

The study of protein stability is currently an essential process for the development of vaccine products that contain these as an active ingredient. This work was carried out at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Camagüey, where the Technological Development area is currently working on the design of a vaccine against ticks. The objective of this work was to determine the inactivation time of the protein Bm86 carrying the peptide P0, applying accelerated studies of heat stress in order to predict the stability of the vaccine against ticks, based on the Arrhenius equation. Different studies were also carried out to analyze the possible inactivation pathways of the Bm86 protein. The results obtained indicated that

at a storage temperature between 2 °C and 8 °C, the protein, as an active pharmaceutical ingredient, has a predictive duration time of approximately 2.5 years before 10% of it is inactivated.

Keywords: Arrhenius equation; Accelerated stability; Bm86 protein; Temperature; Shelf life.

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas, las cuales se definen en (Brandau *et al.*, 2003) como cualquier agente incluyendo péptidos, proteínas, polisacáridos, polinucleótidos, bacterias y virus que son usadas para generar un estado inmune profiláctico, representan el más grande logro de la medicina moderna en la prevención de enfermedades.

La habilidad de una vacuna para poseer sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y biológicas en los límites específicos durante el tiempo de vida definido se refiere como estabilidad. El tiempo de vida es el periodo de tiempo en el cual una vacuna se mantiene estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas (Sarmad *et al.*, 2019).

Existen dos categorías principales de muestreo de la estabilidad para determinar el tiempo de vida de vacunas, la estabilidad en tiempo real y la estabilidad acelerada. El almacenamiento de vacunas bajo condiciones de almacenamiento recomendadas se refiere como la estabilidad en tiempo real o en condición real, mientras que en la estabilidad acelerada el producto es almacenado bajo condiciones de elevado estrés (Fox & Haensler, 2013). La estabilidad en tiempo real y acelerada es empleada para definir el patrón de degradación que ocurre cuando una vacuna falla en lograr sus resultados potenciales. La estabilidad térmica acelerada de vacunas durante su tiempo de vida tiene un impacto vital en su potencia, debido a que la temperatura afecta directamente su estabilidad, mientras que la degradación del inmunógeno depende de las condiciones medioambientales y de almacenamiento (Sarmad *et al.*, 2019).

En la actualidad existen diferentes procedimientos en el estudio predictivo acelerado de la estabilidad de proteínas. Una de estas formas es a partir de la inactivación de muestras proteicas por acción del calor, determinándose cuantitativamente las proteínas inactivadas, para predecir el tiempo que demora en inactivarse a determinada temperatura de almacenamiento y conservación. Esto es posible mediante el empleo de la ecuación de Arrhenius, a partir de la dependencia de la velocidad de inactivación con la temperatura de almacenamiento del ingrediente farmacéutico activo (IFA).

Se considera que las predicciones de la estabilidad a largo plazo a partir de datos de estabilidad acelerada son usualmente imposibles de realizar para compuestos biológicos debido a las modificaciones dependientes de la temperatura, tiempo y concentración. Durante el estudio de la agregación, los investigadores han encontrado ya sea comportamientos que no siguen el perfil de Arrhenius (Brummitt *et al.*, 2011; Kayser *et al.*, 2011; Wang & Roberts, 2013) o que siguen el perfil de Arrhenius pero que están limitados a intervalos de concentración y temperatura estrechos (Paborji *et al.*, 1994; Borgia *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios recientes indicaron la posibilidad de predecir perfiles de agregación a largo plazo a partir de datos de estabilidad acelerada y ciertos parámetros biofísicos seleccionados mediante modelos no lineales, esto es, redes neurales artificiales (Gentiluomo *et al.*, 2020) u otros métodos multivariados (Gentiluomo *et al.*, 2020; Gentiluomo *et al.*, 2020). El perfil de Arrhenius fue también demostrado para la potencia de la vacuna para ser utilizado con el fin de manejar la estabilidad después de un cambio de proceso (Egan & Schofield, 2009), y para predecir con exactitud la estabilidad a largo plazo (Clénet, 2018). Los perfiles de largo plazo de antigenicidad que fueron predichos mediante un análisis de la cinética de Arrhenius para seis meses de datos de estabilidad acelerada fueron verificados con datos experimentales de estabilidad de hasta tres años (Clénet, 2018). Otros autores (Kuzman *et al.*, 2021) demostraron la predicción exacta de la estabilidad a largo plazo (hasta tres años) para varios anticuerpos monoclonales terapéuticos y proteínas de fusión a partir de los datos de estabilidad acelerada de corto plazo (hasta seis meses) mediante la aplicación de la modelación cinética usando la ecuación de Arrhenius. Además, los autores (Moriconi *et al.*, 2020) emplearon la modelación cinética basada en Arrhenius para

diseñar el proceso de envejecimiento de vacunas hechas a la medida bajo investigación con un nivel predefinido de O-acetilación para obtener las especificaciones clínicas verificadas.

La cuantificación de proteína es a menudo necesaria para la investigación biológica, bioquímica, clínica, farmacéutica, y de tecnología alimenticia, así como también para aplicaciones industriales (Goldring, 2019). Entre los métodos más utilizados y novedosos para el estudio cuantitativo y estructural de proteínas se encuentra el ensayo del ácido bicinconínico (ABC) (Cortés-Ríos *et al.*, 2020). Otro método de estudio, en este caso estructural y de fragmentación, es la electroforesis para, a partir de las estructuras de las proteínas, determinar sus fragmentos (Olichon *et al.*, 2007). Estos métodos mencionados pueden ser utilizados para determinar la degradación producto de la inactivación de la proteína a diferentes temperaturas y con ello llegar a predecir su posible estabilidad.

Para la elaboración de las vacunas veterinarias se emplean proteínas extraídas de diversas muestras biológicas, las que proveen la actividad farmacológica necesaria para el tratamiento o cura de las principales enfermedades que afectan a las diferentes especies de animales.

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey, se realiza la producción de vacunas y bioproductos de uso veterinario y agrícola. Actualmente en el área de desarrollo tecnológico del CIGB se trabaja en el diseño de una vacuna contra las garrapatas. Dicha vacuna posee como principio activo el conjugado entre la proteína Bm86 y el péptido P0 (pP0). El pP0 es un componente estructural de los ribosomas de todos los organismos y es fundamental para la viabilidad celular. Aparte de su función estructural en los ribosomas, existen evidencias que indican que la proteína P0 desfosforilada interviene en la reparación del ADN en el núcleo (Gong *et al.*, 2008).

Sin embargo, los péptidos son generalmente malos inmunógenos y son rápidamente aclarados del torrente sanguíneo. Es por ello que, en vacunas, se usan conjugados a proteínas altamente inmunogénicas que mejoran su presentación al sistema inmune del individuo vacunado. Considerando las propiedades adyuvantes descritas para las nano partículas de Bm86 producidas por la levadura *P. pastoris* en el CIGB, esta proteína es la candidata más adecuada y factible para la presentación eficiente del pP0 al sistema inmune del hospedero, porque además esta proteína es en sí misma un inmunógeno contra garrapatas (Rodríguez-Mallon *et al.*, 2020).

El conjugado Bm86/pP0 al igual que todas las proteínas puede sufrir un proceso de inactivación térmica ya que se componente estructural es la proteína Bm86. Este proceso de inactivación depende del tiempo de exposición de la proteína a determinadas condiciones de temperatura. La inactivación de la proteína Bm86 provoca la pérdida de unidades estructurales, lo que causa la disminución de la actividad inmunológica del conjugado y, como consecuencia, la pérdida de efectividad de la vacuna en el tiempo. Hasta el momento no se conoce el tiempo de inactivación, ni el fenómeno mediante el cual ocurre dicha inactivación. Para poder determinar qué tiempo tarda la vacuna contra las garrapatas sin perder su actividad inmunológica se requiere determinar cuánto demora la proteína Bm86 sin inactivarse a la temperatura de almacenamiento (2 °C a 8 °C). De esta manera, en el presente trabajo se determina el tiempo de durabilidad del IFA Bm86 mediante un estudio de estabilidad acelerada basado en la ecuación de Arrhenius.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Almacenamiento y toma de las muestras de IFA

Para realizar el estudio de estabilidad mediante el método acelerado de estrés térmico, se emplearon muestras pertenecientes a tres lotes de producción diferentes (14P.IFA.2108E, 14P.IFA.2201E y el lote 14P.IFA.2203E). A continuación, se describe el procedimiento seguido:

- Las muestras se almacenaron en bolsas flexboy de la firma Sartorius® de material etilvinilacetato a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
- Las muestras se incubaron a diferentes temperaturas: 55 °C, 37 °C y 25 °C.
- Teniendo en cuenta que la inactivación aumenta a mayores valores de temperatura, se fijaron diferentes tiempos: 24 h, 48 h y 72 h respectivamente.

2.2. Cuantificación de proteínas por el método del ABC

La cuantificación de proteínas en los conjugados se realizó por el ensayo del ABC, siguiendo el protocolo de ensayo establecido en el Procedimiento Patrón de Operación (PPO) 2.31.282.17 (CIGB, 2017). Se utilizó un patrón de la proteína ASB (albumina de suero bovina) de concentración conocida, realizando diluciones seriadas en el rango de 0,0625 a 1 mg/mL. La observancia fue medida en un espectrofotómetro de placas Multiskan (Thermo Scientific®) a 562 nm de longitud de onda.

2.3. Análisis cualitativo por ensayo de InmunoDot-BLOT

Para el ensayo se realizó tipo sándwich siguiendo de ensayo ITD 64.341.02 (CIGB, 2011), en donde se recubrió la membrana de nitrocelulosa con el propio conjugado Bm86/pP0. El segundo anticuerpo de acoplamiento a la proteína BM86 fue el CBSSE2.3-HRP, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante para el desarrollo de la señal coloreada.

2.4. Análisis por electroforesis SDS-PAGE del conjugado

Para determinar la posible degradación del conjugado Bm86/pP0 se realizó un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Dicho análisis se le realizó a las muestras al inicio y al final del estrés térmico para cada una de las temperaturas. Para ello se siguió el método reportado en el PPO 4.09.004.91 (CIGB, 1991).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación del tiempo de durabilidad del IFA BM86 mediante el estudio de estabilidad acelerada

Para la predicción de la estabilidad de la proteína BM86 se empleó el método de estabilidad acelerada basado en la ecuación de Arrhenius. El primer paso del estudio consiste en la determinación del orden de reacción.

3.2. Determinación del orden de reacción

Una vez que el conjugado fue sometida a diferentes temperaturas y tomadas las muestras según los intervalos de tiempo descritos para cada temperatura, se procedió a su cuantificación mediante el ensayo de ABC usando para ello la curva de calibración de BSA (Figura 1).

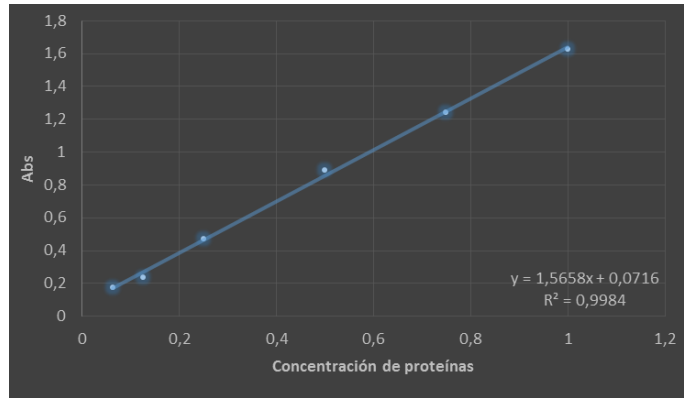
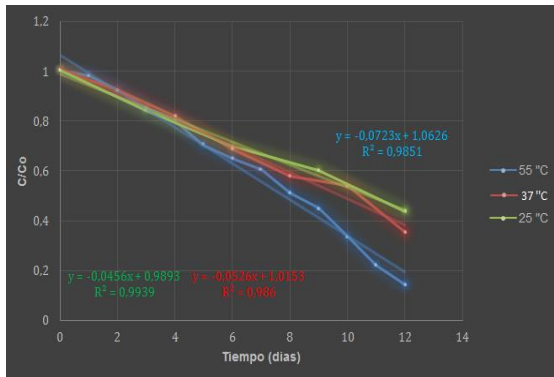


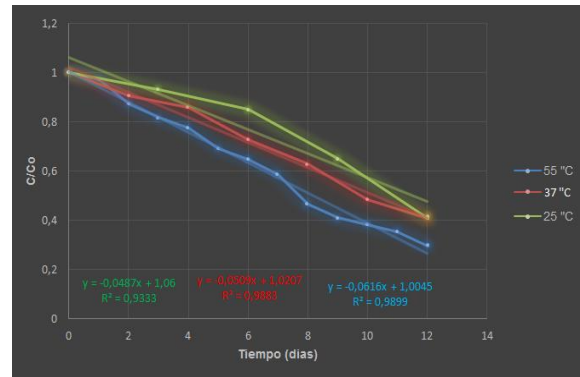
Figura 1. Curva de calibración usada en la técnica de ABC.
Fuente: Elaboración propia.

A partir de los valores de concentración de la proteína Bm86 en los lotes de conjugados (datos no mostrados), los cuales fueron graficados y presentados en la Figura 2, se calcularon los parámetros siguientes para determinar el orden de la reacción:

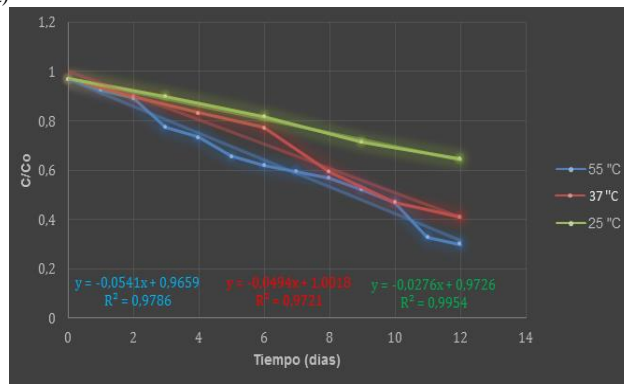
- $c(\text{Bm86}/c(\text{Bm86}_0))$
- $\ln(c(\text{Bm86}/c(\text{Bm86}_0)))$
- $1/(c(\text{Bm86}/c(\text{Bm86}_0)))$
- $1/(c(\text{Bm86}/c(\text{Bm86}_0))^2)$



(a)



(b)



(c)

Figura 2. Comportamiento de la concentración de la proteína Bm86 en el tiempo. (a) Lote 14P.IFA.2108E. (b) Lote 14P.IFA.2201E. (c) Lote 14P.IFA.2203E.

Fuente: Elaboración propia.

Las variaciones de los parámetros calculados se correlacionaron linealmente con respecto al tiempo (en días). En la Figura 3 se muestran los gráficos obtenidos para determinar el orden de nuestro sistema para la temperatura de 55 °C del lote 14P.IFA.2208E. El resto de los gráficos se muestran en los Anexos del 1 al 8. El mejor ajuste se obtuvo para el orden cero de reacción.

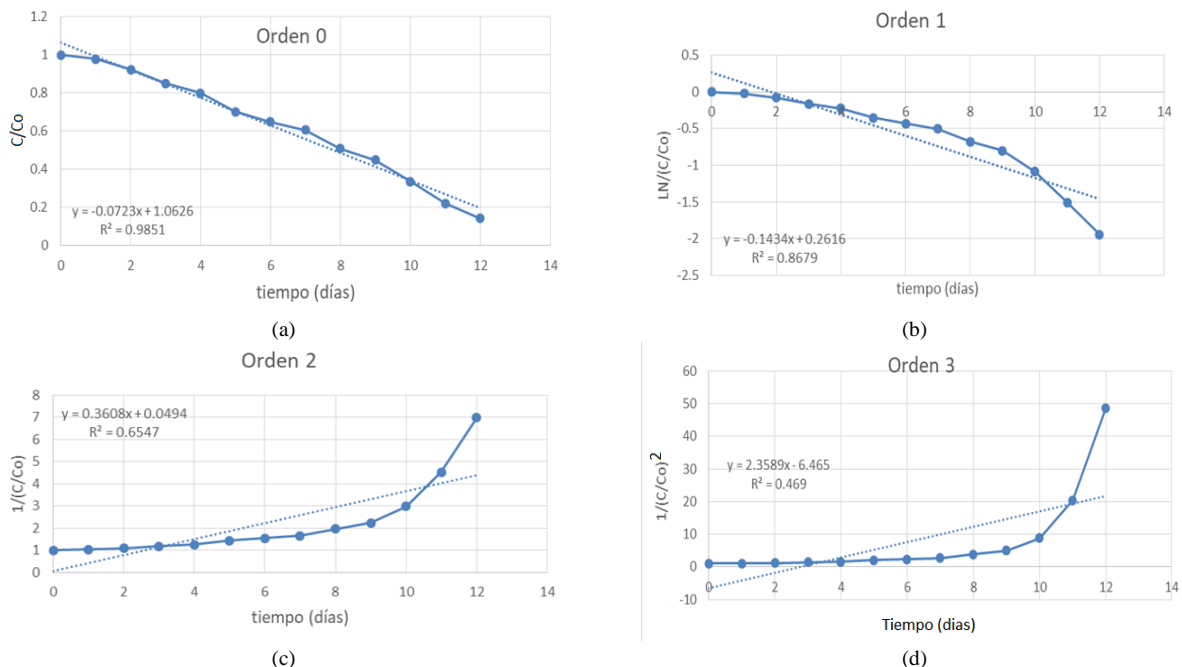


Figura 3. Orden de reacción con respecto al tiempo a 55 °C de temperatura para el lote 14P.IFA.2108E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, también se calculó el coeficiente de determinación para cada una de las curvas anteriormente mencionadas, con el fin de determinar así el orden de reacción (Tabla 1). Los mayores valores se obtuvieron para el orden de reacción cero, que corresponden a la curva de C/C_0 vs. tiempo. Este resultado indica que la reacción es de orden cero y, por tanto, la velocidad instantánea de reacción de dicha proteína, en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, es directamente proporcional a la concentración.

Tabla 1. Coeficientes de determinación para las diferentes temperaturas de los lotes.

Parámetros	Lote 14P.IFA.2108			Lote 14P.IFA.2201			Lote 14P.IFA.2203		
	55 °C	37 °C	25 °C	55 °C	37 °C	25 °C	55 °C	37 °C	25 °C
(C/C_0)	0,9851	0,9860	0,9939	0,9899	0,9883	0,9333	0,9786	0,9721	0,9954
$\ln (C/C_0)$	0,8679	0,9437	0,9801	0,9789	0,9627	0,8722	0,9337	0,9461	0,9919
$1/(C/C_0)$	0,6547	0,8892	0,9325	0,927	0,9146	0,7975	0,8279	0,9062	0,9830
$1/(C/C_0)^2$	0,469	0,6784	0,8629	0,8454	0,7864	0,7222	0,7018	0,7447	0,9692

Fuente: Elaboración propia

Basado en la ecuación de orden cero obtenida se obtiene que:

$$C = C_0 - k \cdot t \quad (1)$$

Donde C es la concentración en el tiempo de la proteína, Co es la contracción inicial de la proteína, k es la constante de velocidad y t es el tiempo.

A partir de cada curva de orden cero (ver en la sección de Anexos) se obtuvieron las constantes de velocidad para cada temperatura, los cuales se expresan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de la constante cinética k para cada temperatura en los tres lotes

Temperatura	Lote 14P.IFA.2108	Lote 14P.IFA.2201	Lote 14P.IFA.2203
55 °C	0,0723	0,0616	0,0541
37 °C	0,0526	0,0509	0,0494
25 °C	0,0456	0,0487	0,0276

Fuente: Elaboración propia

3.3. Determinación de la energía de activación (Ea) y el factor pre-exponencial de Arrhenius (A)

Según la expresión de Arrhenius:

$$k = A e^{\frac{-Ea}{R \cdot T}} \quad (2)$$

Al linealizarla aplicando logaritmo neperiano en ambos miembros de la ecuación (2) se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{R \cdot T} \quad (3)$$

Graficando los valores del ln k correspondientes a cada temperatura para los 3 lotes contra el inverso de la temperatura (Tabla 3), se obtiene una curva cuyo intercepto es el ln A y la pendiente es Ea/R.

Tabla 3. Datos transformados de la velocidad de reacción en función de la temperatura para confección del grafico de Arrhenius

Temp. (K ⁻¹)	Lote 14P.IFA.2108	Lote 14P.IFA.2201	Lote 14P.IFA.2203	Promedio
1/T	ln k	ln k	ln k	ln k
0,00304878	-2,62693115	-2,787093408	-2,916921093	-2,77698188
0,00319489	-2,94503916	-2,977892355	-3,007804855	-2,97691212
0,0033557	-3,08784756	-3,022076249	-3,589939506	-3,23328777

Fuente: Elaboración propia

La ecuación ajustada fue:

$$\ln k = 1455,5 \cdot \frac{1}{T} - 1,767 \quad (4)$$

La curva de Arrhenius (Figura 4), presentó un coeficiente de determinación con valor R² = 0,9981, lo cual evidencia un buen ajuste de los datos al modelo de Arrhenius y puede ser utilizada para estudios predictivos de estabilidad. Según la expresión linealizada de Arrhenius, el valor de la pendiente es igual a -Ea/R y el

intercepto es igual a $\ln A$. Empleando el valor de universal de los gases $R = 8,314 \text{ J/mol.K}$, se determina que $E_a = 12\,101,027 \text{ J/mol}$ y $A = 0,1717 \text{ días}^{-1}$

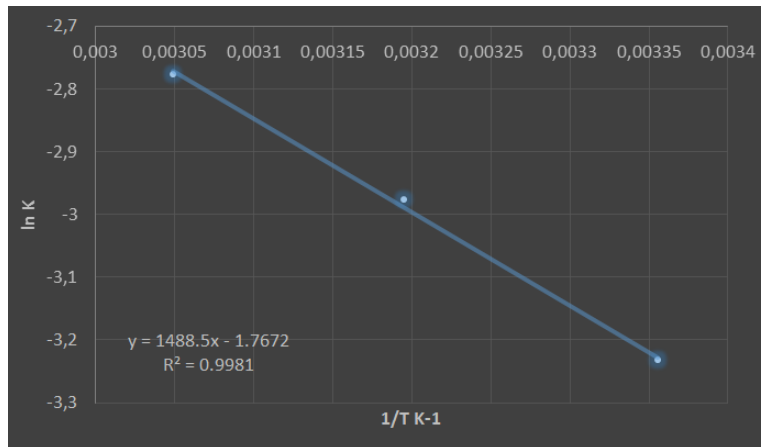


Figura 4. Gráfico de Arrhenius para la inactivación de la proteína.
Fuente: Elaboración propia.

Existen diferentes investigaciones realizadas a estabildades de otras proteínas con resultados cercanos a los obtenidos para la proteína Bm86. Según (Torres *et al.*, 2001) la energía de activación de una proteína parecida a la nuestra es de $15,17 \text{ Kcal/mol}$. Otros autores (Schleicher *et al.*, 1989) presentaron para la proteína rodopsina de peso molecular de 48 kDa , un valor de $E_a = 16,5 \text{ kJ/mol}$. Finalmente según (Sant'Anna *et al.*, 2012), el péptido P34 presenta inactivación por acción térmica de primer orden, con un valor de $E_a = 9 \text{ kJ/mol}$ en leche descremada y $13,6 \text{ kJ/mol}$ en leche entera.

3.4. Determinación del tiempo de duración de la proteína Bm86

Empleando la energía de activación y la constante de Arrhenius se determinó la constante de velocidad cinética para las posibles temperaturas de almacenamientos de la proteína conjugada, las cuales fueron de $4, 8$ y 25 °C . En la Tabla 4 se exponen los valores de esta constante cinética según la temperatura de almacenamiento evaluada.

Tabla 4: Valores de la constante cinética calculadas para cada una de las posibles temperaturas de almacenamiento

Constante	Temperatura		
	4 °C	8 °C	25 °C
k (días ⁻¹)	9,17E-04	9,87E-04	1,33E-03

Fuente: Elaboración propia

Teniendo en cuenta que la proteína conjugada será el principio activo de varias formulaciones para vacunas veterinarias, se decidió tomar como criterio una degradación máxima permisible del 10%. Es decir, el 90% de la proteína debe mantenerse activa, esto es, $C/C_0 = 0,9$. Sustituyendo este valor y la constante de velocidad determinada para las 3 posibles temperaturas de almacenamiento en la ecuación de orden cero descrita anteriormente, se obtiene el tiempo que la proteína conjugada se degrada un 10 %.

$$\frac{C}{C_0} = -k \cdot t \quad (5)$$

Se obtuvieron los tiempos de estabilidad a varias temperaturas (Tabla 5). Este resultado es muy positivo porque permite que se produzcan las vacunas con un margen de tiempo factible para la implementación de

las diferentes etapas de producción de las vacunas. Suministra la capacidad de almacenar el IFA hasta 2 años.

Tabla 5. Tiempos de estabilidad

Estabilidad	Temperatura	Temperatura	Temperatura
90%	4 °C	8 °C	25 °C
Días	981	911	678
Años	2,688	2,496	1,858

Fuente: Elaboración propia

3.5. Determinación de la presencia del conjugado Bm86/pP0 por SDS-PAGE

En la Figura 5 se presentan la SDS-PAGE realizadas a muestras el día cero. Todos los lotes presentaban bandas de alta pureza sin degradación. Para el ensayo no se contó con marcador de peso molecular.

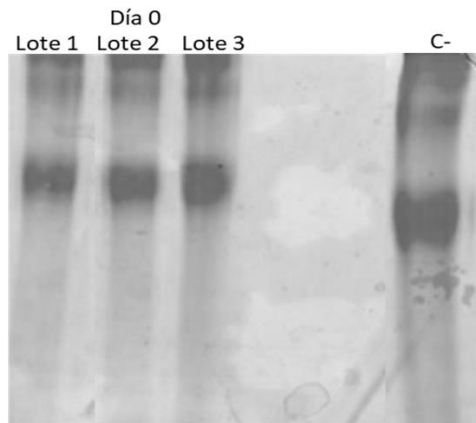


Figura 5. SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8% realizadas a muestras el día cero. Lote 1 es el 14P.IFA.2108, lote 2 es el 14P.IFA.2201, el lote 3 es el 14P.IFA.2203 y el control negativo es la proteína Bm86 lote 14.1903-5.

Fuente: Elaboración propia.

El día 12 del ensayo se repitió el SDS-PAGE con el objetivo de medir si había decaído la pureza del conjugado para los tres lotes evaluados y las tres temperaturas aplicadas (Figura 6).

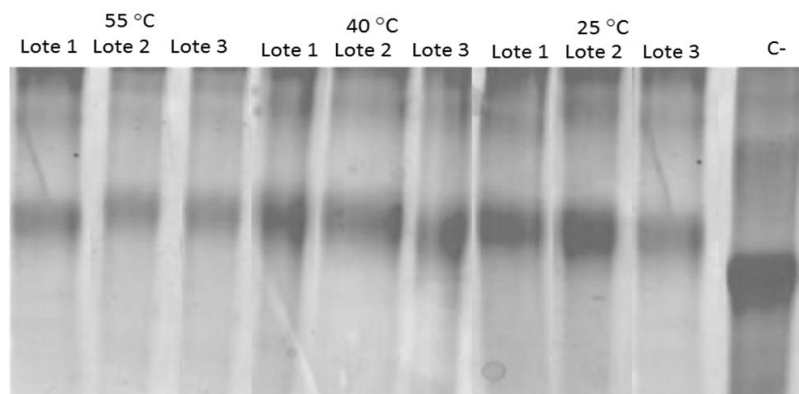


Figura 6. SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8% realizadas a muestras el día 12. Lote 1 es el 14P.IFA.2108, lote 2 es el 14P.IFA.2201, el lote 3 es el 14P.IFA.2203 y el control negativo es la proteína Bm86 lote 14.1903-5.

Fuente: Elaboración propia.

El resultado obtenido a los 12 días de iniciado en ensayo se corrobora con la disminución de la concentración de proteínas determinado por SDS-PAGE. Los 3 lotes mostraron una disminución en el contenido de pP0 sobre todo a la temperatura de 55 °C. La pureza de las muestras se mantiene invariable, y aún después de los 12 días a 55 °C se mantiene el conjugado estable.

3.6. Determinación de la presencia del péptido pP0

En la Figura 7, se expone el InmunoDot realizado a los tres lotes el día cero. Todos los lotes mostraron una alta presencia del pP0, evidenciando que el aumento del peso molecular de los conjugados se debe a la incorporación del péptido.

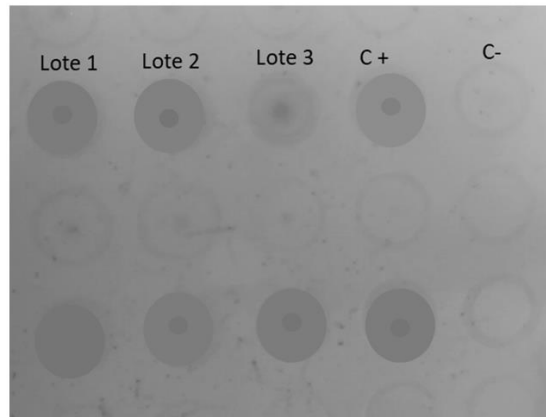


Figura 7. InmunoDot realizado los lotes de IFA el día cero. Lote 1 es el 14P.IFA.2108, lote 2 es el 14P.IFA.2201, el lote 3 es el 14P.IFA.2203. Control positivo lote de 14P.IFA.2202E usado en ensayos de potencia con altos valores de títulos de anticuerpo, control negativo PBS.

Fuente: Elaboración propia.

El día 12 del ensayo se repitió el InmunoDot con el objetivo de medir si había decaído la presencia del pP0 en el conjugado (Figura 8).

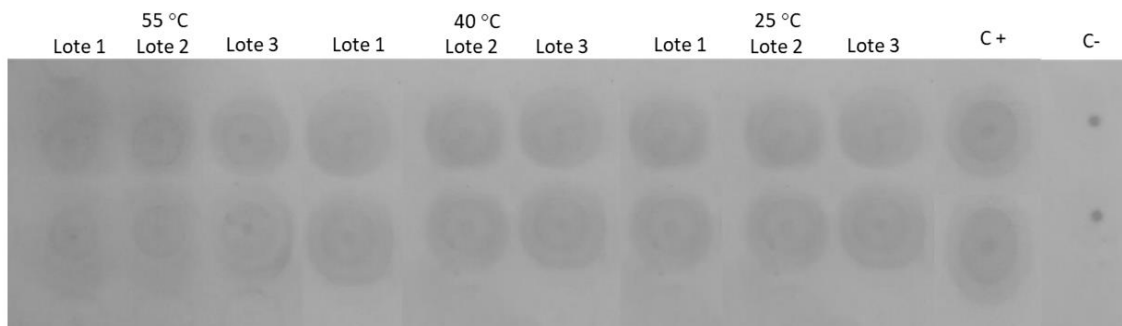


Figura 8. InmunoDot realizado a los lotes de IFA el día 12. Lote 1 es el 14P.IFA.2108, lote 2 es el 14P.IFA.2201, el lote 3 es el 14P.IFA.2203. Control positivo lote de 14P.IFA.2202E usado en ensayos de potencia con altos valores de títulos de anticuerpo, control negativo PBS.

Fuente: Elaboración propia.

El resultado del InmunoDot también indica la disminución de la estabilidad del conjugado, al presentarse éste mucho más claro sobre todo a la temperatura de 55 °C. Sin embargo, aún es visible indicando así la presencia del pP0. Estos resultados nos permiten afirmar que el estudio de estabilidad acelerada fue un éxito y nos da la posibilidad de predecir que el IFA Bm86/pP0 puede ser estable por un periodo de tiempo de poco más de 2 años a 4 °C.

4. CONCLUSIONES

El método de Arrhenius se ajustó satisfactoriamente al sistema compuesto por el conjugado Bm86/pP0, permitiendo realizar predicciones de estabilidad térmica a tiempo real.

Se determinó que la estabilidad del IFA Bm86/pP0 puede de ser mayor a 2 años a una temperatura de 4 °C.

REFERENCIAS

Borgia, M. B., Nickson, A. A., Clarke, J., & Hounslow, M. J. (2013). A Mechanistic Model for Amorphous Protein Aggregation of Immunoglobulin-like Domains. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 6456–6464. doi: 10.1021/ja308852b.

Brandau, D. T., Jones, L. S., Wiethoff, C. M., Rexroad, J., & Middaugh, C. R. (2003). Thermal Stability of Vaccines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (2). 218-231.

Brummitt, R. K., Nesta, D. P., & Roberts, C. J. (2011). Predicting Accelerated Aggregation Rates for Monoclonal Antibody Formulations, and Challenges for Low-Temperature Predictions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (10), 4234-4243. doi: 10.1002/jps.22633.

CIGB. (1991). Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. (PPO 4.09.004.91, pp. 21). La Habana, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

CIGB. (2011). Inmunodot. (ITV 64.341.02, pp. 4). La Habana, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

CIGB. (2017). Determinación de la concentración de proteínas totales por el método del Ácido Bicinónico (BCA) empleando soluciones comerciales y soluciones preparadas. (PPO 2.31.282.17, pp. 8). La Habana, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Clénet, D. (2018). Accurate prediction of vaccine stability under real storage conditions and during temperature excursions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 125, 76-84. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.01.005.

Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes, E., Rodríguez, M., López, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608, 113904. doi: 10.1016/j.ab.2020.113904.

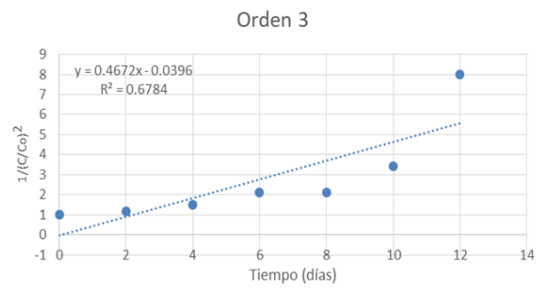
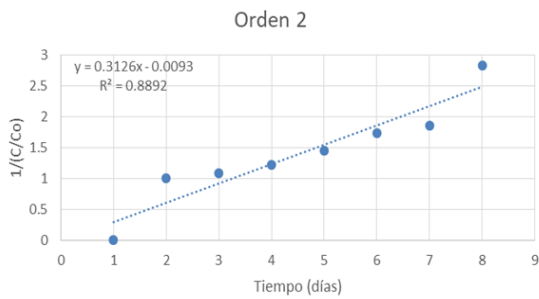
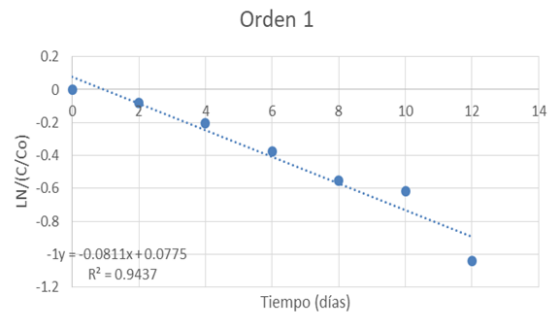
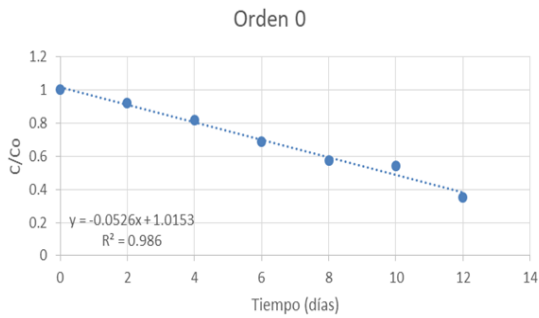
Egan, W., & Schofield, T. (2009). Basic principles of stability. *Biologicals*, 37, 379-386. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.08.012.

Fox, C. B., & Haensler, J. (2013). An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*, 12 (7), 747-758.

Gentiluomo, L., Roessner, D., & Frieß, W. (2020). Application of machine learning to predict monomer retention of therapeutic proteins after long term storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 577, 119039. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119039.

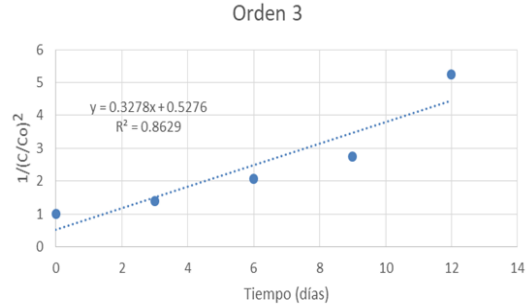
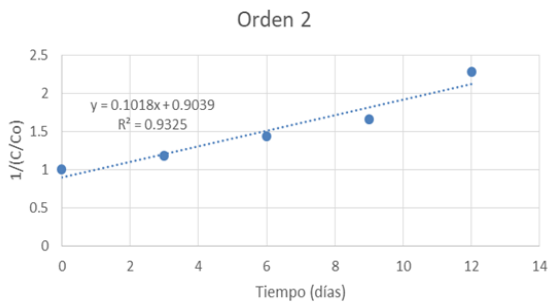
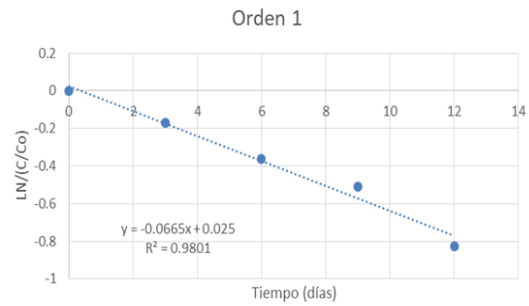
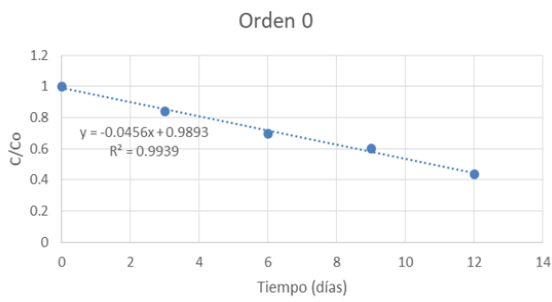
- Gentiluomo, L., Svilenov, H. L., Augustijn, D., Bialy, I. E., Greco, M. L., Kulakova, A., Frieß, W. (2020). Advancing Therapeutic Protein Discovery and Development through Comprehensive Computational and Biophysical Characterization. *Molecular Pharmaceutics*, 17, 426-440. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00852.
- Goldring, J. P. D. (2019). Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 1855, 31-39. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_3.
- Gong, H., Liao, M., Zhou, J., Hatta, T., Huang, P., Zhang, G., Fujisaki, K. (2008). Gene silencing of ribosomal protein P0 is lethal to the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Veterinary Parasitology*, 151, 268–278. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.11.015.
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Helk, B., Forrer, K., & Trout, B. L. (2011). Evaluation of a Non-Arrhenius Model for Therapeutic Monoclonal Antibody Aggregation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (7), 2526-2542. doi: 10.1002/jps.22493.
- Kuzman, D., Bunc, M., Ravnik, M., Reiter, F., Žagar, L., & Bončina, M. (2021). Long-term stability predictions of therapeutic monoclonal antibodies in solution using Arrhenius-based kinetics. *Nature Scientific Reports*, 11, 20534. doi: 10.1038/s41598-021-99875-9.
- Moriconi, A., Onnis, V., Aggravi, M., Parlati, C., Bufali, S., Cianetti, S., Berti, F. (2020). A new strategy for preparing a tailored meningococcal ACWY conjugate vaccine for clinical testing. *Vaccine*, 38, 3930–3933. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.04.005.
- Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S., & Marco, A. d. (2007). Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnology*, 7 (7), 1-8. doi: 10.1186/1472-6750-7-7.
- Paborji, M., Pochopin, N. L., Coppola, W. P., & Bogardus, J. B. (1994). Chemical and Physical Stability of Chimeric L6, a Mouse-Human Monoclonal Antibody. *Pharmaceutical Research*, 11 (5), 764-771.
- Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P. E., Bello, Y., Rosales, K., Montero, C., Vargas, M., & Estrada, M. P. (2020). A chemical conjugate of the tick P0 peptide is efficacious against *Amblyomma mixtum*. *Transbound Emerg Dis*, 00, 1-3. doi: 10.1111/tbed.13455.
- Sant'Anna, V., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2012). Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Chemistry*, 130, 84-89. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.001.
- Sarmad, M., Mehmood, M. D., Anwar, H., Ghani, M. U., Farwa, K., & Munir, S. (2019). Influence of Accelerated Temperature on Thermal Stability of Inactivated Oil Based Vaccines. *International Journal of Biology*, 11 (4), 101-111.
- Schleicher, A., Kuhn, H., & Hofmann, K. P. (1989). Kinetics, Binding Constant, and Activation Energy of the 48-kDa Protein-Rhodopsin Complex by Extra-Metarhodopsin II. *Biochemistry*, 28, 1770-1775.
- Torres, A., Guerra, M., & Rosquete, Y. (2001). Estimación de la vida útil de una fórmula dietética en función de la disminución de lisina disponible. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21 (2), 129-133.
- Wang, W., & Roberts, C. J. (2013). Non-Arrhenius Protein Aggregation. *The AAPS Journal*, 15 (3), 840-851. doi: 10.1208/s12248-013-9485-3.

ANEXOS



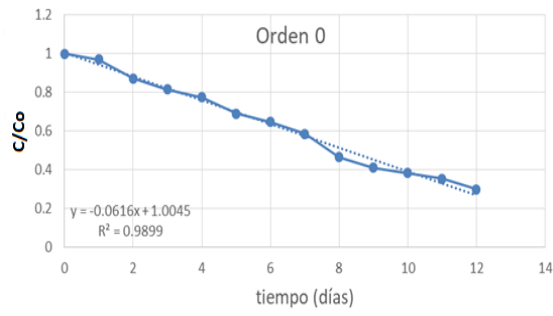
Anexo 1. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 37 °C para el lote 14P.IFA.2108E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

Fuente Elaboración propia.

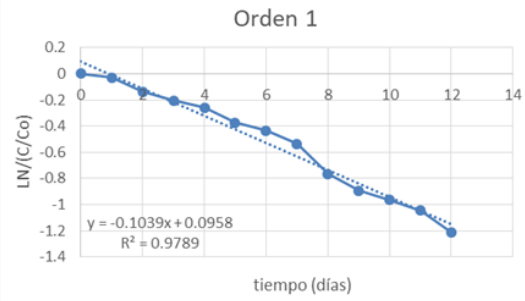


Anexo 2. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 25 °C para el lote 14P.IFA.2108E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

Fuente Elaboración propia.



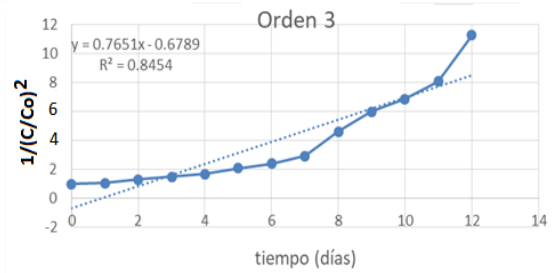
(a)



(b)



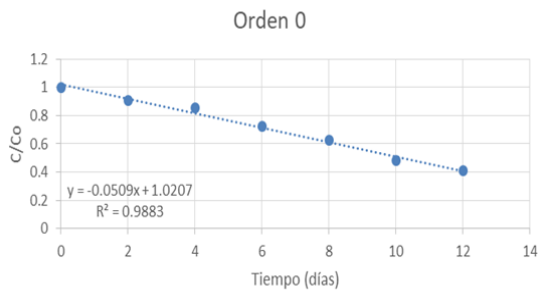
(c)



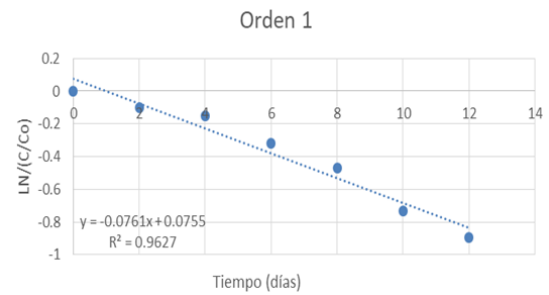
(d)

Anexo 3. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 55 °C para el lote 14P.IFA.2201E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

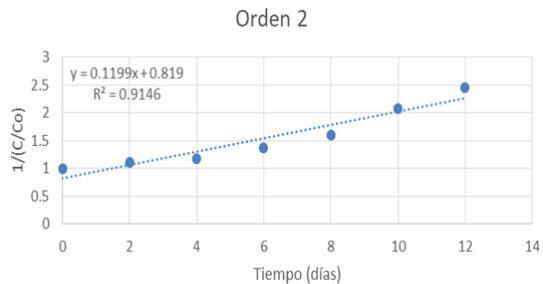
Fuente Elaboración propia.



(a)



(b)



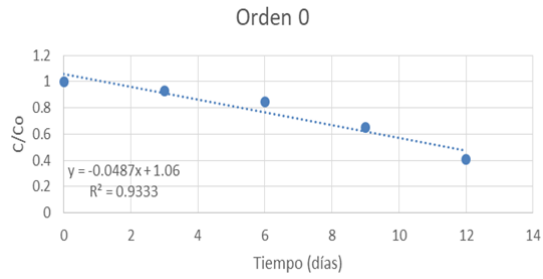
(c)



(d)

Anexo 4. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 37 °C para el lote 14P.IFA.2101E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

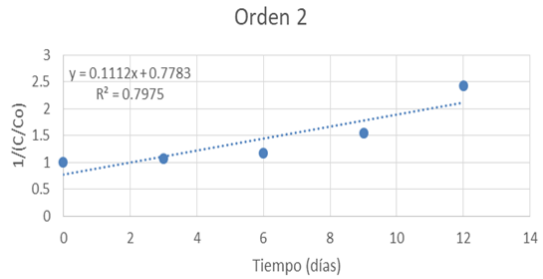
Fuente Elaboración propia.



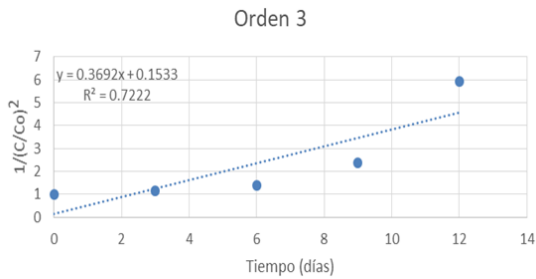
(a)



(b)



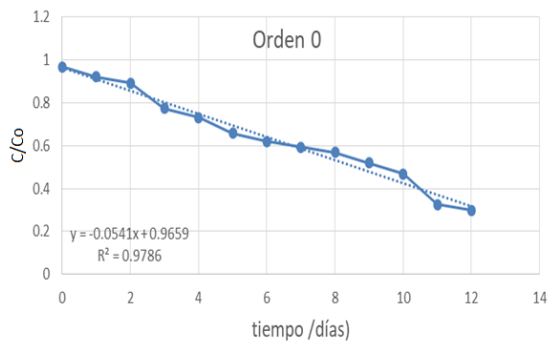
(c)



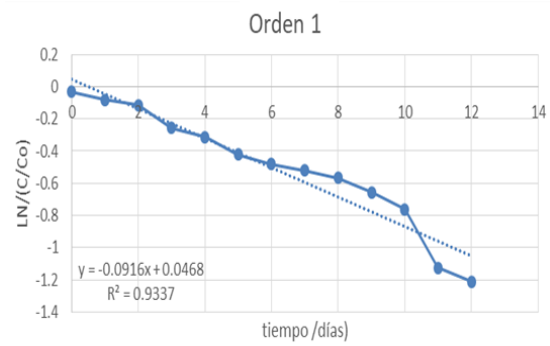
(d)

Anexo 5. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 25 °C para el lote 14P.IFA.2101E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

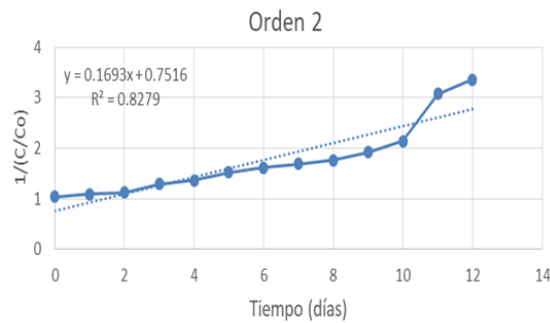
Fuente Elaboración propia.



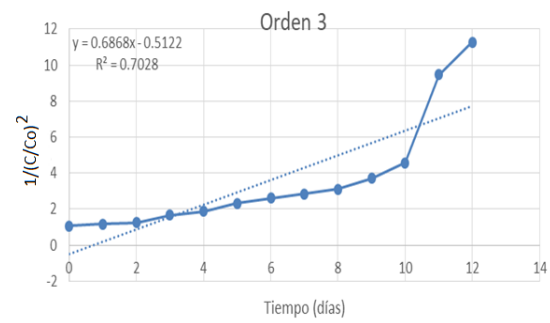
(a)



(b)



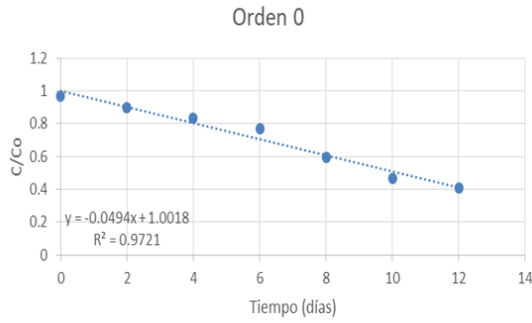
(c)



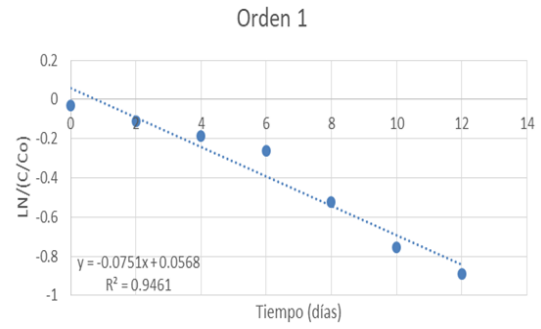
(d)

Anexo 6. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 55 °C para el lote 14P.IFA.2103E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

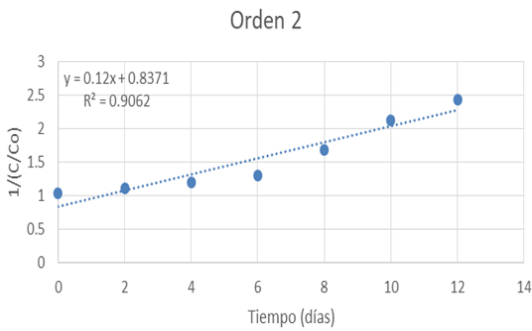
Fuente Elaboración propia.



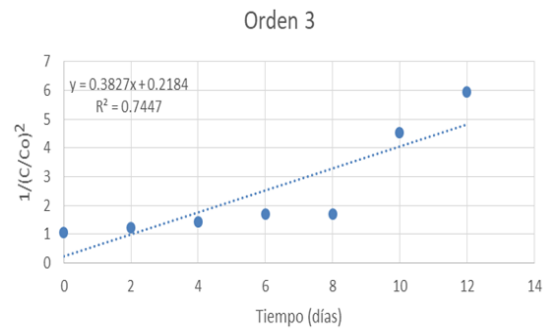
(a)



(b)



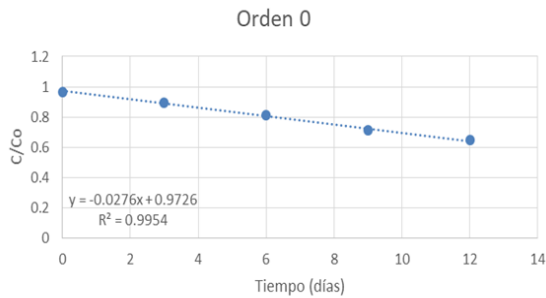
(c)



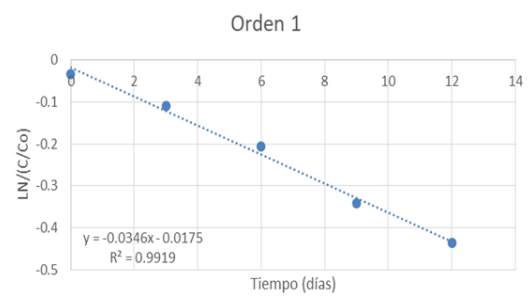
(d)

Anexo 7. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 37 °C para el lote 14P.IFA.2103E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

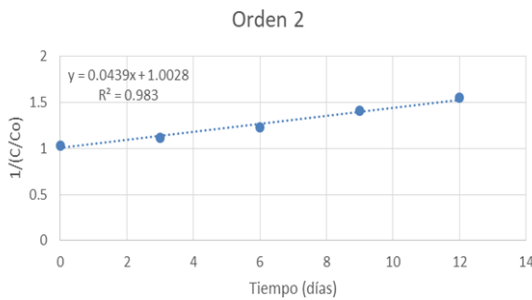
Fuente Elaboración propia.



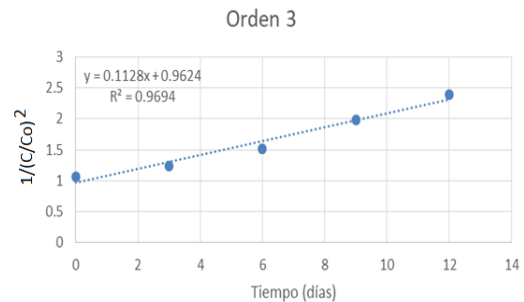
(a)



(b)



(c)



(d)

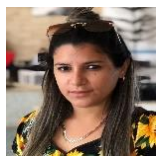
Anexo 8. Determinación del orden de reacción a una temperatura de 25 °C para el lote 14P.IFA.2103E. (a) Orden 0. (b) Orden 1. (c) Orden 2. (d) Orden 3.

Fuente Elaboración propia.

SEMBLANZA DE LOS AUTORES



Omar Díaz González: Obtuvo el título de Lic. Químico en la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba en el año 2019. Actualmente labora en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en donde es Jefe de Proyecto en el Grupo de Desarrollo. En estos momentos se encuentra cursando un Doctorado en Ingeniería Química en la Universidad de Camagüey, Cuba. Su área de investigación está enmarcada en el diseño de procesos productivos de vacunas, escalado de procesos productivos, evaluación técnico-económica de procesos y operaciones de la industria biotecnológica.



Roxana Barrios Taura: Obtuvo el grado de Ingeniero Químico en la Universidad de Camagüey en el año 2021. Actualmente labora en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en donde es adiestrada. Su área de investigación abarca el diseño de procesos productivos de vacunas, escalado de procesos productivos, evaluación técnico-económica de procesos y operaciones de la industria biotecnológica.



Rutdali María Segura Silva: Obtuvo el grado de Ingeniero Químico por la Universidad de Camagüey en el año 2001. Actualmente labora en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en donde es Tecnóloga de Primer Nivel y Especialista Principal del Grupo de Desarrollo. Su área de investigación abarca el diseño de procesos productivos de vacunas, evaluación técnico-económica de procesos y operaciones de la industria biotecnológica, así como también el diseño y evaluación de equipos de transferencia de calor y masa. Es Máster en Análisis de Procesos por la Universidad de Camagüey desde el año 2013.



Laritza Caridad Domínguez Rabilero: Graduada de licenciatura en Ciencias Alimentarias en la Universidad de Camagüey en el año 2014. Realizó un Máster en Bioquímica especialidad Biología Molecular en la Universidad de la Habana en 2021. Actualmente trabaja en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en el Departamento de Investigación y Desarrollo, específicamente en el área de Bioproductos Agropecuarios.



Amaury Pérez Sánchez: Obtuvo el grado de Ingeniero Químico en la Universidad de Camagüey, Cuba, en el año 2009, donde actualmente es profesor instructor e investigador auxiliar. En estos momentos se encuentra estudiando un Máster en Biotecnología en el centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey. Trabaja en líneas de investigación vinculadas fundamentalmente con el diseño de equipos de transferencia de calor y masa, simulación y optimización de procesos y operaciones de la industria química mediante el empleo de simuladores, y la evaluación técnico-económica de procesos y plantas biotecnológicas.