(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 549 690**

(21) Número de solicitud: 201300887

(51) Int. CI.:

A61K 35/12 (2015.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A2

(22) Fecha de presentación:

27.09.2013

(30) Prioridad:

18.10.2012 MX MX/A/2012/012132

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.10.2015

(71) Solicitantes:

INOSAN BIOPHARMA, S.A. (100.0%)
Lucerna, nº 7, Col. Juárez
06600 México D.F. MX

(72) Inventor/es:

LÓPEZ DE SILANES PÉREZ, Juan

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ PRIETO, Ángel

(54) Título: **Inmunoterapéuticos polivalentes de alta especificidad basados en anticuerpos modificados y formulación liofilizada inyectable altamente segura y eficaz**

(57) Resumen:

Inmunoterapéuticos polivalentes de alta especificidad basados en anticuerpos modificados y formulación liofilizada inyectable altamente segura y eficaz.

La invención se relaciona con la producción y desarrollo de una formulación inyectable liofilizada de anticuerpos modificados o variantes de ellos, altamente específicos neutralizantes de mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos que tienen diferentes actividades específicas y pueden incluir pero no se limitan a venenos de animales ponzoñosos. Por conveniencia haremos referencia a venenos, pero se incluyen todo tipo de venenos de animales terrestres y marinos. También está dirigida al método de producción que incluye la hiperinmunización de mamíferos para la producción de anticuerpos altamente específicos, el proceso de modificación (fragmentación) y purificación, y finalmente la formulación inyectable liofilizada, que le confiere propiedades de alta pureza y alta especificidad.

ES 2 549 690 A2

DESCRIPCIÓN

INMUNOTERAPÉUTICOS POLIVALENTES DE ALTA ESPECIFICIDAD BASADOS EN ANTICUERPOS MODIFICADOS Y FORMULACIÓN LIOFILIZADA INYECTABLE ALTAMENTE SEGURA Y EFICAZ

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con inmunoterapéuticos Polivalentes de alta especificidad, modificación de anticuerpos y el proceso de producción involucrado.

Antecedentes de la invención

Los envenenamientos por animales ponzoñosos son reconocidos como un problema de salud pública en algunas regiones del planeta, donde la interacción del hombre con estos animales es frecuente. Podemos llamar animales ponzoñosos y/o venenosos a aquellos animales que producen sustancias con actividad farmacológica que puede interferir con nuestra supervivencia. Los venenos más estudiados son los venenos que provienen de serpientes, escorpiones, arañas, moluscos y microorganismos, sin embargo existen otros animales venenosos que incluyen a peces, ranas, insectos, anemonas, corales entre otros.

Para contrarrestar los efectos del veneno se han empleado antídotos basados en la manipulación del sistema inmune de mamíferos donde las inmunoglobulinas o anticuerpos juegan el papel central. En 1888 Emilie Roux y Alesandre Yersin demostraron que la sangre de animales inmunizados contra toxinas diftéricas, proporcionaban protección a los animales cuando se retaban contra toxinas. Para 1890 Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato confirmaron la transferencia de la inmunidad pasiva contra toxinas de difteria y tétanos, este año es considerado como el inicio de la seroterapia, y también es considerado la primera generación de antivenenos, la segunda generación corresponde a inmunoglobulinas purificadas del suero, y la siguiente generación la constituyen los fragmentos de inmunoglobulinas.

La producción de fragmentos F(ab´)2 y Fab, ha sido descrita en la literatura desde principios del siglo pasado, en 1936 I. A. Parfentjev (Pat. Nos. US 2,065,196, US 2,123,198 y US 2,175,090). La mayoría de los métodos se basan en el aprovechamiento de las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas de las proteínas, como son la solubilidad, la forma, la afinidad. Por lo que a lo largo de los últimos años han existido algunas aproximaciones para la producción de fragmentos de anticuerpos F(ab´)2 y Fab como es el caso de Landon Pat. No. US 5,733,742, Sullivan et al., y la US 4,849,352.

Sin embargo, el desarrollo actual de las tecnologías de análisis de proteínas se ha convertido en una herramienta para el desarrollo y mejoramiento de anticuerpos modificados por digestión enzimática, debido a que han permitido una mayor caracterización de los inmunógenos empleados en la producción de plasmas hiperinmunes de mamíferos, así como el proceso de cuantificación de la actividad neutralizante de los anticuerpos específicos, y el control del proceso de purificación.

La producción de anticuerpos modificados (fragmentos) se lleva acabo cuando las inmunoglobulinas (IgG) son digeridas enzimáticamente con diferentes enzimas proteolíticas como la pepsina o papaína, en ambos casos se elimina la fracción Fc, pero en el caso de la pepsina se obtiene un fragmento F(ab´)2 y en el caso de la papaína dos fragmentos Fab. Estos fragmentos F(ab´)2 mantienen las características de los anticuerpos completos, con respecto a su especificidad, afinidad y estabilidad. Además de que la ausencia de la región Fc de los anticuerpos, elimina la aparición de efectos adversos (como pueden ser las reacciones anafilácticas), debido a que la región Fc se une a varios receptores celulares como el receptor del Fc y otras moléculas del sistema inmunitario como las proteínas del complemento, además de otras funciones efectoras como la opzonización, lisis celular y desgranulación de las células cebadas, basófilos y eosinofilos.

La patente mexicana MX230257 de J. López de Silanes et al, de Instituto Bioclon y sus equivalentes las patentes Nos. US 6,709,655, US 7,485,303 y la US 8,075,893, se refieren al método para preparar una composición farmacéutica que comprende fragmentos F(ab')2 presentando características únicas adquiridas por el método de preparación que se encuentran libres de:

- Moléculas de anticuerpo completas
- Moléculas proteicas de otra naturaleza
- Albúmina
- Fibrinógeno
- Partículas virales y
- Pirógenos

Sin embargo no cualquier producto faboterápico se encuentra comprendido en el alcance de la patente MX230257 y sus equivalentes estadounidenses.

Objetivos de la invención

Un objetivo de la invención está relacionado con la producción y desarrollo de una formulación de anticuerpos modificados altamente específicos provenientes de mamíferos.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a la producción y desarrollo de una formulación liofilizada de anticuerpos modificados, altamente específicos o variantes de ellos, provenientes de mamíferos

Otro objetivo de la invención está relacionado con la producción y desarrollo de una formulación de anticuerpos modificados altamente específicos neutralizantes de mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos que tienen diferentes actividades específicas y pueden incluir pero no se limitan a venenos de animales ponzoñosos.

Otro objetivo de la presente invención incluye un método de producción útil para la hiperinmunización de equinos para la producción de anticuerpos altamente específicos, el proceso de modificación (fragmentación) de los anticuerpos y la purificación de los mismos.

Otro objetivo de la invención es el de proporcionar una formulación inyectable liofilizada, propiedades de alta pureza y alta especificidad.

Otros objetivos y aspectos de la presente invención serán obvios para las personas de habilidades ordinarias al considerar la presente divulgación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Muestra dos tablas comparativas de antiveneno de la presente invención para las especies de serpiente B. apser y C. durissus identificadas respectivamente como especie 1 y especie 2 en la segunda tabla de esta figura, contra antivenenos del estado de la técnica. Se expresa el porcentaje de anticuerpos específicos contra venenos utilizados en la inmunización de los caballos productores de anticuerpos, con el objeto de dejar en claro qué porcentaje de las inmunoglobulinas presentes en un vial de los lotes utilizados se unen a los venenos.

Figura 2. Muestra dos tablas comparativas de antiveneno de la presente invención para las especies de serpiente B. apser y C. durissus identificadas respectivamente como especie 1 y especie 2 en la segunda tabla de esta figura, contra antivenenos del estado de la técnica. Se expresa la cantidad en miligramos de antiveneno necesarios para neutralizar un miligramo de venenos utilizados en la inmunización de los caballos productores de anticuerpos.

Figura 3. Electroforesis en la etapa de acondicionamiento del plasma hiperinmune previo a la hidrólisis enzimática. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: estándar de la albúmina 0.5%. Carril 3: estándar de albumina 1.0%. Carril 4: estándar de albumina 3.0%, 4.IgG + IgG(T) al 3%. Carril 5: IlgG + IgG(T) al 5%. Carril 6: IgG + IgG(T) al 7%. Carril 7: IgG + IgG(T) al 10%. Carril 8: Lote 1 de plasma acondicionado antes de la hidrolisis enzimática. Carril 9: Lote 2 de plasma acondicionado antes de la hidrolisis enzimática. Carril 10: Lote 3 de plasma acondicionado antes de la hidrolisis enzimática.

Figura 4. Gráfica que muestra la formación de fragmentos F(ab´)2 durante la digestión enzimática con pepsina.

Figura 5. Etapa de digestión enzimática del plasma acondicionado. Electroforesis (SDS-PAGE) para tres lotes de prueba después de la digestión enzimática con pepsina. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Estándar de albumina 0.5%. Carril 3: Estándar de albumina 1.0%. Carril 4 Estándar de albumina 3.0%, Carril 5 IgG + IgG(T) al 5%. Carril 6: IgG + IgG(T) al 7%. Carril 7: IgG + IgG(T) al 10%. Carril 8: Lote 1 de plasma digerido con pepsina para la producción de fragmentos F(ab´)2. Carril 9: Lote 2 de plasma digerido con pepsina para la producción de fragmentos F(ab´)2. Carril 10: Lote 3 de plasma digerido con pepsina para la producción de fragmentos F(ab´)2.

Figura 6. Etapa de precipitación con Sulfato de Amonio. Electroforesis SDS-PAGE para tres lotes de desarrollo después de la precipitación con sulfato de amonio. Se muestra por la técnica de Salting-out la separación de proteínas no-F(ab')2 (tales como pepsina, fibrinógenos no digeridos, IgG completos y un gran número de péptidos producidos durante la digestión), en una solución de sulfato de amonio de 35% (p/v). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Estándar de albumina 0.5%. Carril 3: Estándar de albumina 1.0%. Carril 4: Estándar de albumina 3.0%. Carril 5: IgG + IgG(T) al 5%. Carril 6: IgG + IgG(T) al 7%. Carril 7: IgG + IgG(T) al 10%. Carril 8: Lote 1 de sobrenadante después de la precipitación con sulfato de amonio.

Carril 9: Lote 2 de sobrenadante después de la precipitación con sulfato de amonio. Carril 10: Lote 3 de sobrenadante después de la precipitación con sulfato de amonio. Se muestra además un cromatograma obtenido de un análisis de HPLC de exclusión molecular donde se observa la composición del sobrenadante en esta etapa que consta de Fragmentos F(ab´)2 y componentes de bajo peso molecular (menos de 20 KDa).

Figura 7. Etapa de Filtración Profunda. Electroforesis (SDS-PAGE) de tres lotes de desarrollo en la etapa de filtración profunda.
Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carril 2: estándar de albúmina 0.5%. Carril 3: estándar de albúmina al 1.0%. Carril 4: estándar de albúmina al 3.0%. Carril 5: IgG + IgG(T) al 3.0%. Carril 6: IgG + IgG(T) al 5.0%. Carril 7: IgG+ IgG(T) al 7.0%. Carril 8: Lote 1 Clarificado. Carril 9: Lote 2 Clarificado. Carril 10 Lote 3 Clarificado. La cromatografía GE-HPLC muestra una reducción de los componentes de alto peso molecular (HMWC) por debajo del 0,45%.

Figura 8. Etapa de Diafiltración. Esta etapa elimina el sulfato de amonio y la mayor parte de péptidos de bajo peso molecular presentes en el producto y se realiza un equilibrio de la isotonicidad de los fragmentos F(ab')2 con solución salina isotónica 0.85%. Análisis de HPLC para el permeado de la de la etapa Ultrafiltración del producto en proceso Al final de este paso el producto se concentra mediante la remoción del solvente por diafiltración forzada. Se presentan los resultados de composición porcentual durante el proceso de diafiltración.. a) Permeado a las 0 diafiltraciones, b) Permeado a las 2 diafiltraciones, c) Permeado a las 4 diafiltraciones, d) Permeado a las 6 diafiltraciones, e) Permeado a las 8 diafiltraciones, f) Permeado a las 10 diafiltraciones.

Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE para los tres lotes en la etapa de diafiltración. Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carril 2: estándar de albúmina 0.5%. Carril 3: estándar de albúmina al 1.0%. Carril 4: estándar de albúmina al 3.0%. Carril 5: lote 1: producto de proceso diafiltrado, 1. Carril 6: lote 2: producto de proceso diafiltrado,. Carril 7: .lote 3: producto de proceso diafiltrado, . Carril 8: IgG + IgG(T) al 3.0%. Carril 9: IgG + IgG(T) al 5.0%. Carril 10: IgG + IgG(T) al 7.0%.

Descripción detallada de la invención

Para mejorar la comprensión y entendimiento se proporcionan las definiciones de los términos empleados en la presente invención, sin embargo estas definiciones no limitan el alcance de la invención.

"Formulación liofilizada inyectable". Se refiere a una forma farmacéutica liofilizada inyectable, que es estéril, libre de contaminaciones (físicas, químicas, microbiológicas y biológicas) con una elevada pureza, mayor al 85%, con una concentración de proteínas totales no mayor al 5%, libre de componentes del plasma de mamíferos y que cumple con las especificaciones de concentración, calidad, pureza, inocuidad y potencia establecidas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y en la United States Pharmacopeia (USP), para una administración intramuscular o intravenosa.

"Anticuerpos modificados". Se refiere a fragmentos bivalentes del tipo $F(ab´)_2$ obtenidos a partir de inmunoglobulinas del tipo G que son modificadas mediante la eliminación de la fracción cristalizable (Fc) y para eliminar el riesgo de reacciones adversas y que son altamente específicos contra los antígenos complejos que generaron las inmunoglobulinas iniciales.

"Alta especificidad". Se refiere a la especificidad del anticuerpo modificado respecto a los antígenos complejos que originaron las inmunoglobulinas de las que fueron generados. Para obtener un inmunoterapéutico de alta especificidad es necesario que los plasmas hiperinmunes, que son la materia de los que se producen, tengan títulos neutralizantes muy altos. Los plasmas con títulos neutralizantes altos hacen que los antivenenos neutralicen una misma cantidad de veneno con menores cantidades de antiveneno, lo que se traduce en una mayor seguridad para los pacientes, al recibir menos cantidades de proteínas heterólogas. Los plasmas con títulos neutralizantes altos se obtienen a través de cinco factores principales: (1) La utilización de venenos de altísima calidad certificada. (2) El uso de venenos inmunizantes provenientes del mayor número de individuos de la misma especie ponzoñosa y de localidades geográficas distintas, para cubrir bien la diversidad bioquímica de la composición de los venenos. (3) El uso racional y alternado de adyuvantes con diferentes mecanismos de acción. (4) La maduración de la respuesta inmune humoral a lo largo de muchos meses (al menos seis). (5) El mantenimiento y manejo óptimo de los caballos productores de los plasmas hiperinmunes que incluye alimentación balanceada, ejercicio, manejo amable y muy importante, la realización de plasmaferesis (regreso del paquete globular) en un periodo no mayor a 120 minutos.

"Antígenos complejos". Son las mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos que tienen diferentes actividades específicas y que pueden provenir pero no se limitan a arácnidos, serpientes, aves, peces, crustáceos, insectos, ranas, anemonas, corales, entre otros.

"Hiperinmunización". Se refiere al proceso sistemático de inoculación (dosis, frecuencia, vía de administración) de una mezcla inmunogénica (que puede estar formadas por proteínas, péptidos, y otros componentes orgánicos e inorgánicos) para la producción de inmunoglobulinas específicas. También comprende la metodología y estrategia experimental para el control y análisis de la actividad neutralizante especifica de las inmunoglobulinas.

Metodología

De acuerdo con la descripción anterior, la obtención de inmunoglobulinas se realiza por medio de la hiperinmunización de mamíferos tales como caballos, ovejas, cabras, conejos entre otros, con antígenos complejos, previamente tratados y procesados con metodologías específicas de detoxificación como puede ser la radiación con rayos gama. Además del seguimiento en esquemas de inmunización diseñados para alcanzar la máxima especificidad, seguida de un proceso de producción de anticuerpos modificados en los cuales se elimina la fracción Fc por una digestión enzimática empleando una enzima proteolítica que en este caso es la pepsina.

El proceso para producción de la formulación liofilizada inyectable de anticuerpos modificados altamente específicos comprende 9 etapas:

En la primera etapa del proceso, se lleva a cabo el acondicionamiento del plasma hiperinmune, diluyéndolo en tres volúmenes de solución salina isotónica (0.85%) pre-tratada con timerosal, seguido de un ajuste de las condiciones de pH de 3.5 a 4.0 y a una temperatura de 18 a 20 ºC (ver figura 1).

La segunda etapa comprende la producción de anticuerpos modificados (fragmentos (fragmentos F(ab')2), por medio de una Digestión Enzimática con Pepsina, para eliminar la fracción Fc, para lo cual se adiciona una solución acida de pepsina pre-tratada y pre-activada hasta alcanzar una concentración final de 0.9 a 1.1 % de pepsina (con al menos 400 UI/g) y se mantiene las condiciones de pH 3,5 y 4,0 y temperatura de 18 a 20 ºC durante 180 minutos para completar la eliminación de la fracción Fc de las inmunoglobulinas (producción de Fragmentos F(ab´)2). Lo cual se verifica mediante un análisis de SDS-PAGE con una concentración máxima de IgG de 2% y una concentración máxima de albumina (la proteína en mayor concentración en el plasma de mamíferos) no mayor al 0.5%. Adicionalmente, durante, el proceso de digestión enzimática se hidrolizan otras proteínas de tamaño molecular grande como son la albumina, fibrinógeno y otros factores de coagulación presentes en el plasmas hiperinmune, digiriéndolos en pequeños péptidos con un peso molecular aproximado de 15 KDa (ver figura 5).

En la tercera etapa. se realiza una precipitación con sulfato de amonio, para lo cual se adiciona al plasma digerido, una solución acuosa de sulfato de amonio al 50% (previamente filtrada a través de un filtro de celulosa de 0.2 micras, para eliminar la posibilidad de una contaminación microbiana), hasta alcanzar una concentración final de saturación del 35% a una temperatura de 2 a 8ºC, para favorecer la precipitación de los componentes de bajo peso molecular (por debajo de los 15 KDa) y para obtener el sobrenadante que contiene los anticuerpos modificados (ver figura 6).

En la cuarta etapa, se realiza una Filtración Profunda, para lo cual se pasa el sobrenadante por un módulo de filtración profunda con fibras de celulosa modificada, el cual contiene un gradiente de filtración nominal final de 100 a 0.8 micras y cumple con el Código de Regulaciones Federales, Título 21, partes 177.2260 e, f, g, h, i, j, k, l de los Estados Unidos (US Code of Federal Regulations Title 21, parts 177.2260 e, f, g, h, i, j, k, l). Y los componentes plásticos están incluidos en el Código de Regulaciones Federales, Título 21, parte 177.1520 (US Code of Federal Regulations Title 21, part 177.1520) (ver figura 7).

En la quinta etapa, el filtrado obtenido (sobrenadante) en el paso anterior, es almacenado a una temperatura de 2°C a 8ºC y se ajusta a un pH de 6.8 a 7.0, para posteriormente clarificarlo mediante diafiltración en un equipo de filtración de flujo tangencial empleando una membrana de polietersulfona de 50 KDa, utilizando buffer de boratos como buffer de diafiltración. Este proceso se realiza en modo de operación continuo y manteniendo un cizallamiento de diafiltración por debajo de 1000 sec-1, lo que permite eliminar el sulfato de amonio empleado en la precipitación, además de eliminar los componentes de bajo peso molecular (por debajo de 15 KDa) que pudieran estar presentes después de la digestión enzimática (ver figuras 8 y 9).

En la sexta etapa, el producto diafiltrado es recuperado en contenedores estériles libres de pirógenos, y se pasa a través de un filtro de 20 nanómetros de tamaño de poro, a esta operación se le denomina nanofiltración por el tamaño de poro en el orden de nanómetros. La nanofiltración tiene por objetivo eliminar la posible carga viral presente.

En la séptima etapa, una vez nanofiltrado, al producto se adicionan agentes criopreservadores y reguladores de la isotonicidad, en una operación unitaria denominada Formulación, en la que se adiciona manitol 9mg/mL, Alanina 18mg/mL y Polisorbato 80 0.1mg/mL.

En la octava etapa, el producto obtenido en la etapa anterior es filtrado en una área aséptica a través de un filtro PVDF de 0.1 micras para eliminar la posible contaminación microbiana, en una operación denominada Filtración Aséptica Terminal.

En la novena etapa, el producto filtrado es dosificado en viales de tipo I que cumplen con los requerimientos de la FEUM y USP. El producto dosificado en condiciones asépticas, es liofilizado bajo condiciones estándares (congelamiento hasta -40ºC durante 8 horas y un secado primario a los -5ºC con un gradiente de velocidad de +5.2ºC / hora, y un secado secundario a 45ºC durante 10 horas a una velocidad de 9ºC / hora) estas condiciones permiten eliminar hasta el 98% del contenido de agua, como ventaja adicional de la eliminación de agua se incrementa la estabilidad del producto además de que les permite mantener las propiedades biológicas. El producto liofilizado es evaluado en diferentes pruebas que incluyen la hermeticidad, humedad residual, inspección visual al 100% para determinar la presencia de partículas además del análisis de todas las especificaciones de calidad establecidas para un producto inyectable liofilizados que incluyen: esterilidad, inocuidad, seguridad y potencia neutralizante).

Como manera de ilustrar la presente invención, se presentan los siguientes ejemplos, sin que ello limite el alcance de la misma.

Ejemplo 1.
Hiperinmunización de equinos y producción de inmunoglobulinas de alta especificidad empleando el método de la presente invención.

La figura 1 muestra dos tablas comparativas de antiveneno de la presente invención para las especies de serpiente B. asper y C. durissus, contra antivenenos del estado de la técnica en términos porcentuales. La medición experimental se hizo por cromatografía de afinidad de la siguiente manera: se acopló, covalentemente, cada uno de los venenos a partículas de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno. Se montaron columnas de afinidad con las partículas de Sefarosa 4B-Veneno correspondientes. Se hicieron pasar 10 mg de cada uno de los lotes de los antivenenos indicados. Las inmunoglobulinas no específicas pasan a través de la columna de afinidad sin interaccionar con el veneno. Las inmunoglobulinas específicas (anticuerpos específicos) quedan unidos al veneno en la columna y son eluídos con 100 mM de ácido acético. Se mide tanto la cantidad de inmunoglobulinas no específicas como la de anticuerpos específicos para calcular el porcentaje de anticuerpos específicos. Un mayor porcentaje de anticuerpos específicos significa mayor calidad del antiveneno ya que predice la utilización de menos cantidad de proteína para lograr el efecto terapéutico y, por ende, una mayor seguridad del antiveneno.

Los antivenenos producto de la presente invención (inmunoterapéuticos de alta especificidad) tienen en promedio 17.7 y 19.7 % de anticuerpos específicos, respectivamente, para cada uno de los venenos usados en la inmunización de los caballos.

Los antivenenos del estado de la técnica fluctuaron entre 4.3 y 13.8 % de anticuerpos específicos para el veneno de B. asper y entre 3.7 y 10.1 % para el veneno de C. durissus. La cantidad de proteína total por vial es menor en tanto el porcentaje de anticuerpos específicos es mayor y viceversa.

Ejemplo 2.
Determinación de la alta especificidad de las inmunoglobulinas producidas en equinos hiperinmunizados, empleando el método de la presente invención.

La figura 2 muestra dos tablas comparativas de antiveneno de la presente invención para las especies de serpiente B. apser y C. durissus, contra antivenenos del estado de la técnica. Se expresa la cantidad en miligramos de antiveneno necesarios para neutralizar un miligramo de venenos utilizados en la inmunización de los caballos productores de anticuerpos, la cual se determinó midiendo la dosis efectiva media (DE50) de antiveneno, retando con tres veces la dosis letal media (DL50), siguiendo las condiciones y protocolos descritas en Casasola et al, 2009. La DE50 se obtiene como microlitros de antiveneno para neutralizar tres DL50 y, como se conoce la concentración de proteínas de los antivenenos, pueden calcularse las DE50s como cantidades de proteína. Por otro lado, la DL50 tiene su equivalencia en masa de veneno, por lo que la conversión a mg de antiveneno necesarios para neutralizar un miligramo de veneno es directa.

En este caso, entre menos miligramos de antiveneno sean necesarios para neutralizar un mg de veneno, el antiveneno es superior, pues se reduce la cantidad de antiveneno para alcanzar la efectividad terapéutica.

Los inmunoterapéuticos de alta especificidad de la presente invención necesitan, en promedio, 6.4 y 11.6 mg, respectivamente, para neutralizar el veneno de B. asper y C. durissus, respectivamente. En tanto que para los antivenenos del estado de la técnica requieren entre 9 y 49 mg para neutralizar el veneno de B. asper y entre 18.2 y 34.9 para neutralizar el veneno de C. durissus.

Ejemplo 3.
Evaluación y control de la producción de anticuerpos modificados (fragmentos F(ab´)2) a través de la aplicación del proceso de la presente invención.

La figura 3 muestra el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras (4% del gel concentrador y 12% del gel separador) en la etapa de acondicionamiento del plasma hiperinmune previo a la hidrólisis enzimática, se muestra la composición del plasma hiperinmune antes del proceso de producción descrito en la presente invención. En la figura 4 se representa la cinética de formación de fragmentos F(ab´)2, durante el tratamiento del plasma hiperinmune con pepsina, la cual fue determinada evaluada mediante electroforesis mediante SDS-PAGE y comparada contra estándares de concentraciones conocidas de IgGs. En la cinética se observa que bajo las condiciones del proceso de la presente invención, se puede alcanzar una eficiencia de no menos del 95% de formación de fragmentos F(ab´)2.
Lo anterior se corrobora en la figura 8 que presenta los resultados del análisis de HPLC de exclusión molecular, después de la diafiltración de los anticuerpos modificados, que permite determinar la composición porcentual de los componentes de Fab, $F(ab´)_2$, dímero, oligómeros solubles e impurezas de bajo peso molecular, bajo condiciones de polaridad apropiadas de fase móvil empleando un soporte con características específicas de exclusión molecular y un sistema de medición con un detector ultravioleta a 280 nanómetros. En la figura 8 el orden de elusión es: oligómeros solubles, dímero, $F(ab´)_2$, Fab y componentes de bajo peso molecular. Donde se observa una pureza mayor al 85% de fragmentos F(ab´)2

Ejemplo 4.
Evaluación de las especificaciones de calidad de una forma farmacéutica liofilizada inyectable basada en Anticuerpos modificados (Fragmentos F(ab`)2) de acuerdo a las especificaciones de calidad de la FEUM y USP.

El proceso de producción de inmunoterapéuticos de alta especificidad basados en fragmentos F(ab´)2, descritos en esta invención se realiza bajo lineamientos de Buenas prácticas de Manufactura (GMPs) que son los lineamientos que permiten obtener productos a nivel industrial que cumpla los lineamientos establecidos en las Farmacopea Mexicana (FEUM) y la de Estados Unidos de Norteamérica (USP) que establece las principales propiedades de pureza, seguridad, concentración, identidad y potencia, que deben cumplir los productos obtenidos por el proceso descritos.

Los anteriores ejemplos han sido proporcionados solamente por el propósito de ejemplificación y no tienen intención de restringir el alcance o contenidos de la invención. La invención se describe a mayor detalle con referencia a las reivindicaciones que se presentan a continuación.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para preparar una composición de anticuerpos en forma de fragmentos bivalentes del tipo F(ab')2 obtenidos a partir de inmunoglobulinas del tipo G modificadas mediante la eliminación de la fracción cristalizable (Fc), susceptibles de unirse a antígenos complejos correspondientes a mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos que tienen diferentes actividades específicas, provenientes de plasmas hiperinmunes de mamíferos, y que son específicos contra los antígenos complejos que generaron las inmunoglobulinas del tipo del que se han obtenido, en mamíferos específicos contra venenos animales, neutralizantes de antígenos completos, mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos de una alta calidad, caracterizado porque comprende:

etapa 1) diluir el plasma hiperinmune en tres volúmenes de solución salina isotónica (0.85%) pretratada con timerosal, seguido de un ajuste de las condiciones de pH de 3.5 a 4.0, a una temperatura de 18°C a 20°C, para obtener un plasma acondicionado;

etapa 2) adicionar una solución acida de pepsina al plasma acondicionado obtenido en la etapa 1), hasta alcanzar una concentración final de 0.9% a 1.1% de pepsina manteniendo las condiciones de pH y temperatura durante 180 minutos;

etapa 3) adicionar una solución acuosa de sulfato de amonio al 50% al plasma digerido de la etapa 2), hasta alcanzar una concentración final de saturación de 35% v/v a una temperatura de 2°C a 8°C y recuperar el sobrenadante;

etapa 4) filtrar el sobrenadante de la etapa 3) a través de un módulo de filtración profunda y recuperar el sobrenadante;

etapa 5) almacenar el filtrado de la etapa 4) a una temperatura de 2 a 8°C y pH de 6.8 a 7.0 y someter el filtrado a diafiltración en un equipo de filtración de flujo tangencial y recuperar el sobrenadante;

etapa 6) someter a nanofiltración al sobrenadante de la etapa 5) y recuperar el sobrenadante;

etapa 7) adicionar al sobrenadante de la etapa 6) agentes criopreservadores y reguladores de la isotonicidad; y

etapa 8) realizar una filtración aséptica terminal del producto de la etapa 7); y

etapa 9) eliminar el agua de la composición mediante liofilización del producto filtrado de la etapa 8) y secar posteriormente.

2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa 2) la concentración final de IgG es no mayor a 2 % y la concentración de albúmina es no mayor a 0.5 %.

3. Un método de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque en la etapa 4) el módulo de filtración profunda comprende fibras de celulosa modificada, y tiene un gradiente de filtración nominal final de 100 a 0.8 micras.

4. Un método de conformidad con la reivindicación 1, 2 ó 3, caracterizado porque en la etapa 5) la diafiltración se realiza a través de una membrana de polietersulfona de 50 KDa, utilizando buffer de boratos como buffer de diafiltración, de manera continua y manteniendo un cizallamiento de diafiltración por debajo de 1000 sec-1 entre la membrana de filtración tangencial y las proteínas para garantizar un mínimo grado de desnaturalización.

5. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque en la etapa 5) además se realiza un equilibrio de la isotonicidad de los fragmentos F(ab')2 con solución salina isotónica al 0.85%.

6.- Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en la etapa 6) la nanofiltración se realiza a través de un filtro de 20 nanómetros de tamaño de poro.

7. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en el paso 7) los criopreservadores y reguladores de isotonicidad se seleccionan entre manitol, alanina y polisorbato 80.

8. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque, en el paso 7) los criopreservadores y reguladores de isotonicidad se seleccionan entre manitol 9mg/mL, alanina 18mg/mL y polisorbato 80 0.1mg/mL.

9. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque en la etapa 8) se realiza una Filtración Aséptica Terminal a través de un filtro PVDF de 0.1 micras.

10. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque en la etapa 9) la liofilización se lleva a cabo a una temperatura de hasta -40°C durante 8 horas.

11. Un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque, en la etapa 9) el secado primario se realiza a -5ºC con un gradiente de velocidad de +5.2 °C/hora y secado secundario se realiza a 45°C durante 10 horas a una velocidad de 9 °C/hora.

12. Una composición de inmunoterapéuticos polivalentes, caracterizada porque se ha obtenido según el método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13.- Una composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque comprende oligómeros solubles y/o insolubles, dímeros, $F(ab´)_2$, Fab y componentes de bajo peso molecular que presentan una pureza mayor al 85% de fragmentos F(ab´)2.

14.- Una formulación inyectable liofilizada caracterizada porque comprende una composición conforme a las reivindicaciones 12 o 13, en donde los anticuerpos modificados o variantes de ellos, altamente específicos neutralizantes de mezclas heterólogas de proteínas, péptidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos que tienen diferentes actividades específicas y pueden incluir pero no se limitan a venenos de serpientes, alacranes, escorpiones, arañas, moluscos, microorganismos, peces, ranas, insectos, anemonas, corales, combinaciones de los mismos, derivados o producidos por ellos.

15.- Uso de la composición de inmunoterapéuticos polivalentes de especificidad contra venenos animales que comprende anticuerpos modificados específicos provenientes de mamíferos de conformidad con las reivindicaciones 12 o 13, para preparar un medicamento para tratar patologías provocadas por el efecto biológico de un veneno, toxina o sus componentes de un animal ponzoñoso seleccionado de serpientes, alacranes, escorpiones, arañas, moluscos, microorganismos, peces, ranas, insectos, anemonas, corales y combinación de los mismos.

FIGURA 1

ANTIVENENO

LOTE	Cantidad Total de Proteína (mg)	Porcentaje de anticuerpos especificos anti veneno de B. asper	Porcentaje de anticuerpos especificos anti veneno de C. durissus
A	133	17.8	19.4
B	126	15.6	21.6
C	118	19.2	17.3
D	135	18.5	19.7
E	138	17.3	20.7
Promedio	130.0	17.7	19.7
Dev. Est.	7.2	1.2	1.4

ANTIVENENOS

LOTE	Cantidad Total de Proteína (mg)	Porcentaje de anticuerpos especificos para veneno de especie 1	Porcentaje de anticuerpos especificos para veneno de especie 2
Lote A de Productor I	943	4.3	3.7
Lote B de Productor I	979	4.4	4.8
Lote A de Productor II	922	N.D.	N.D.
Lote A de Productor III	374	12.4	10.1
Lote A de Productor IV	275	13.8	8.7

Las especies 1 y 2 corresponden a venenos utilizados en la mezcla de inmunización

FIGURA 2

ANTIVENENO

LOTE	Cantidad Total de Proteína (mg)	mg de AV necesarios para neutralizar un mg de veneno de B. asper	mg de AV necesarios para neutralizar un mg de veneno de C. durissus
A	133	6.6	11.9
B	126	6.3	11.3
C	118	5.9	10.5
D	135	6.7	12.1
E	138	6.8	12.3
Promedio	130.0	6.4	11.6
Dev. Est.	7.2	0.4	0.6

ANTIVENENOS

LOTE	Cantidad Total de Proteína (mg)	mg de AV necesarios para neutralizar un mg de veneno de especie 1	mg de AV necesarios para neutralizar un mg de veneno de especie 2
Lote A de Productor I	943	47.2	31.4
Lote B de Productor I	979	49.0	32.6
Lote A de Productor II	922	22.0	34.9
Lote A de Productor III	374	9.0	18.2
Lote A de Productor IV	275	13.6	24.6

Las especies 1 y 2 corresponden a venenos utilizados en la mezcla de inmunización

FIGURA 3

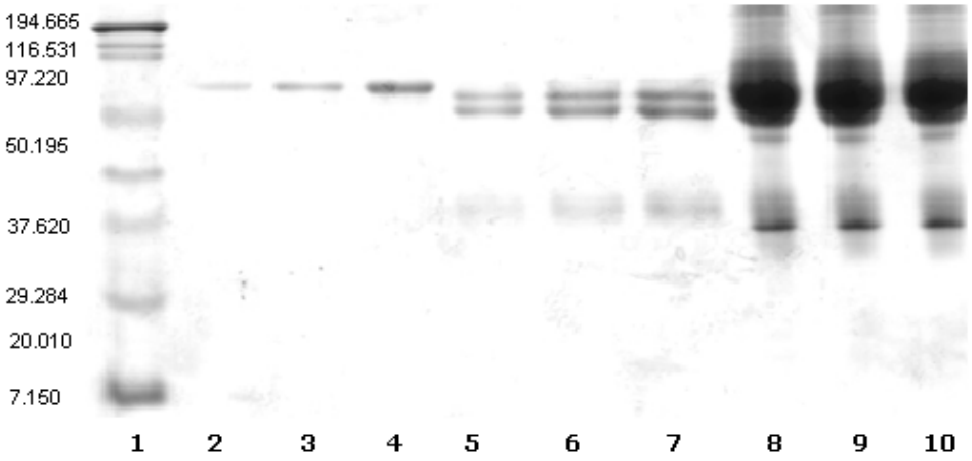

194.665
116.531
97.220
60.195
37.620
29.284
20.010
7.150
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIGURA 4

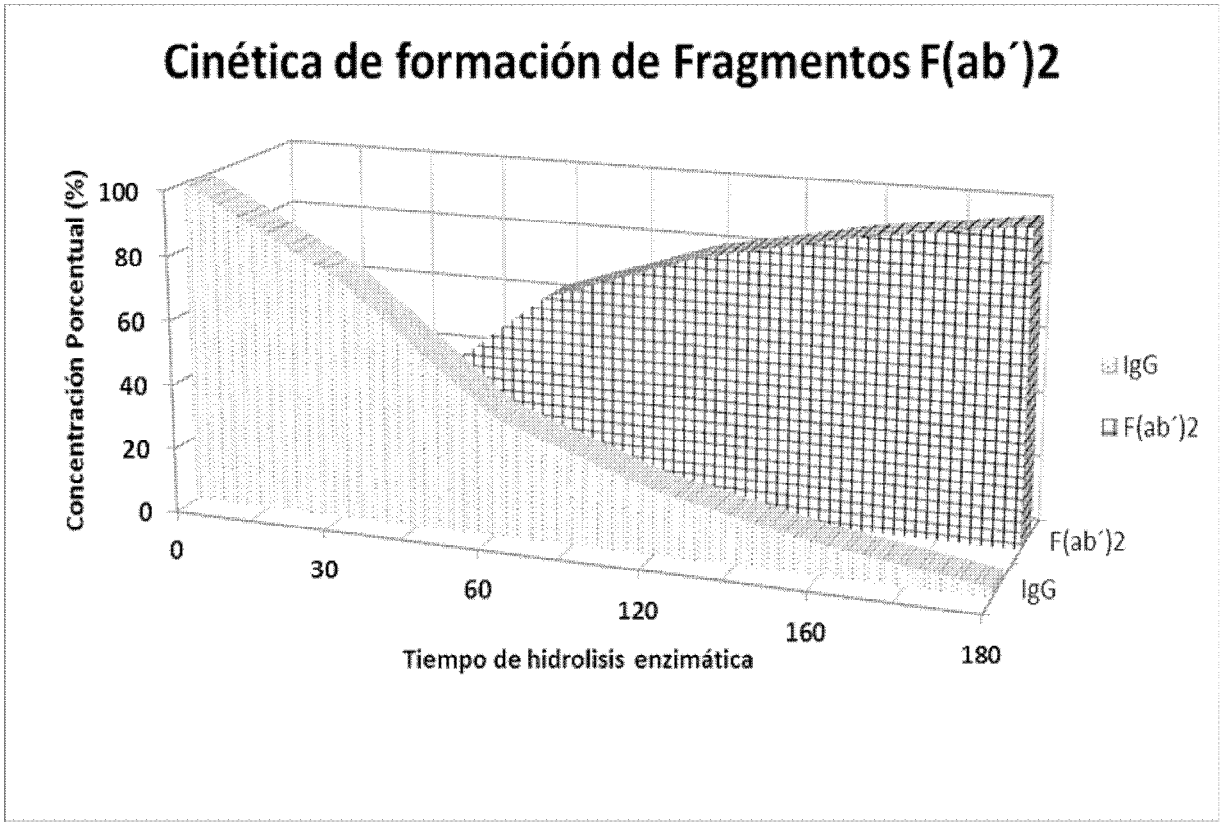

Cinética de formación de Fragmentos F(ab´)2
Concentración Porcentual (%)
100
80
60
40
20
0
0
30
60
120
160
180
Tiempo de hidrolisis enzimática
IgG
F(ab´)2
F(ab´)2
IgG

FIGURA 5

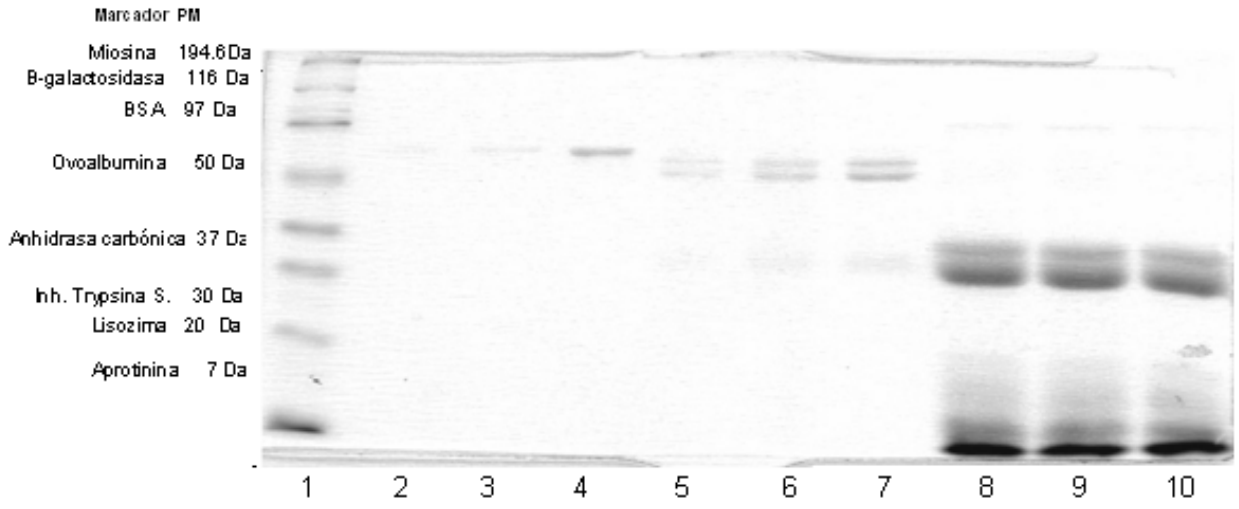
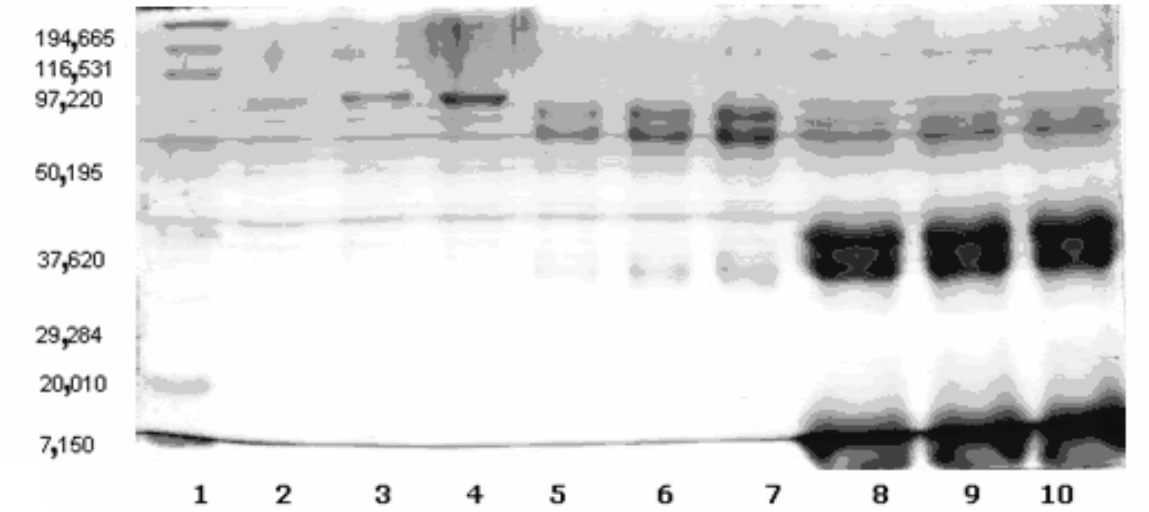

Marcador PM
Miosina 194.6Da
B-galactosidasa 116 Da
BSA 97 Da
Ovoalbumina 50 Da
Anhidrasa carbónica 37 Da
Inh. Trypsina S. 30 Da
Lisozima 20 Da
Aprotinina 7 Da
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIGURA 6


194,665
116,531
97,220
50,195
37,620
29,284
20,010
7,150
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

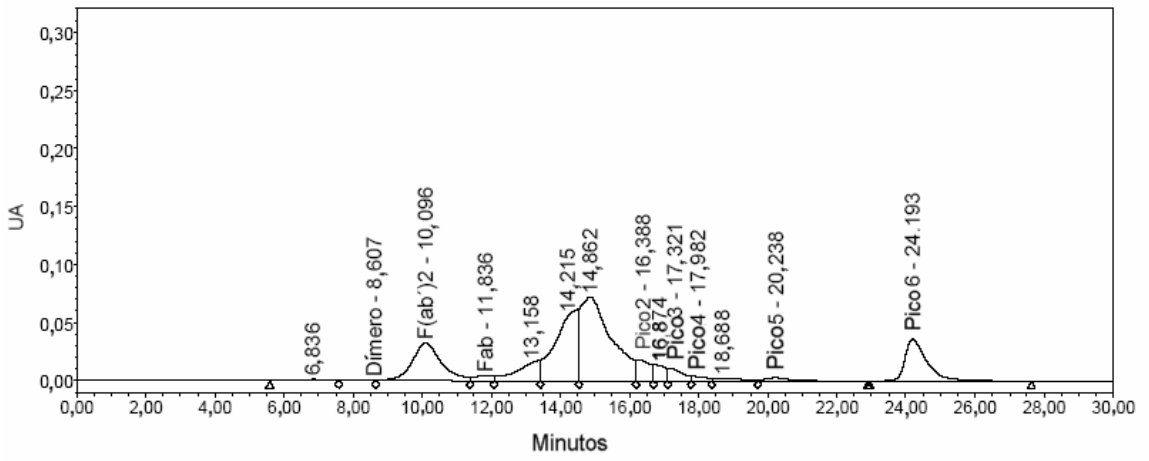

UA
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
6,836
Dímero - 8,607
F(ab')2 - 10,096
Fab - 11,836
13,158
14,215
14,862
Pico2 - 16,388
16,874
Pico3 - 17,321
Pico4 - 17,982
18,688
Pico5 - 20,238
Pico 6 - 24.193
0,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
20,00
22,00
24,00
26,00
28,00
30,00
Minutos

FIGURA 7

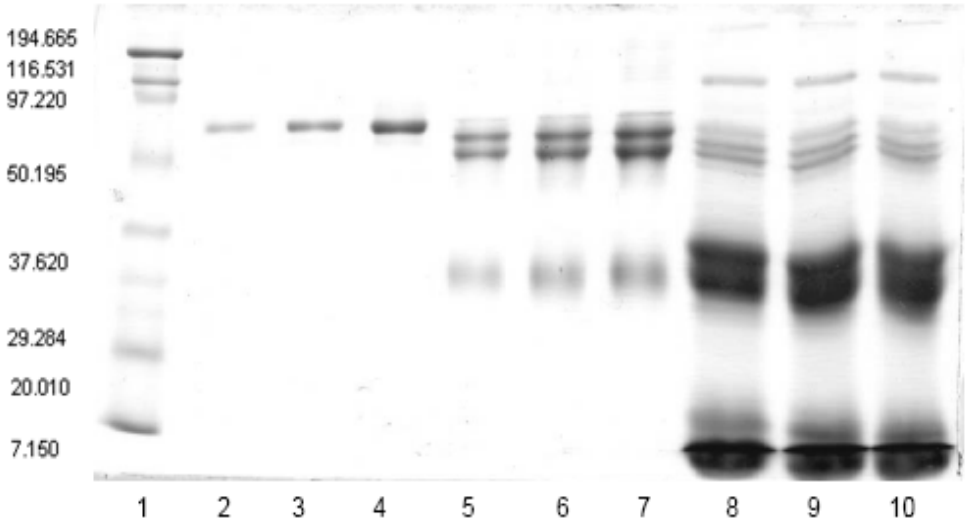

194.665
116.531
97.220
50.195
37.620
29.284
20.010
7.150
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIGURA 8a

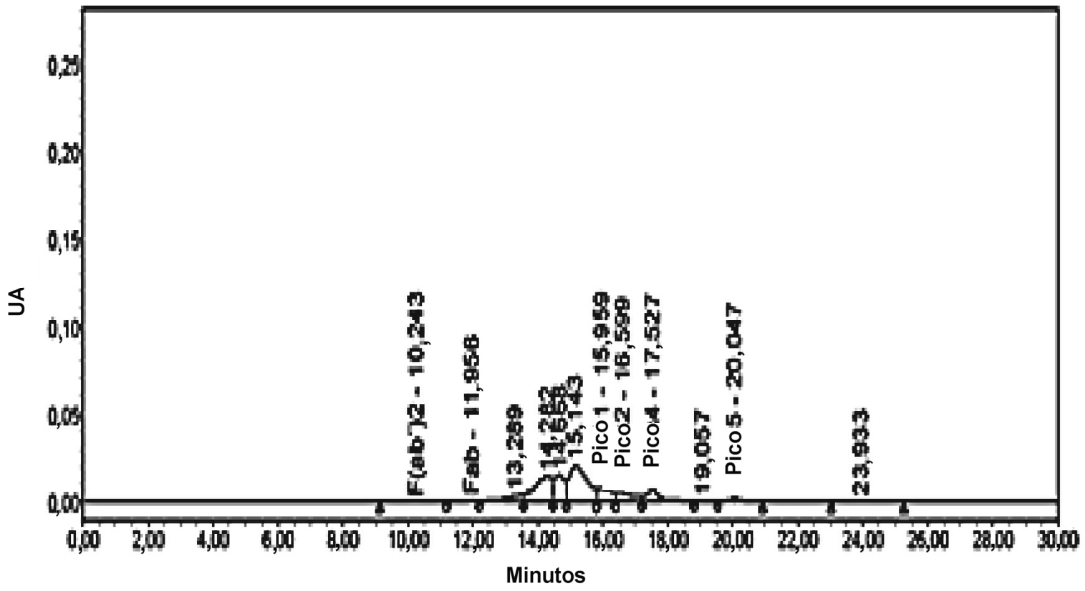


FIGURA 8b

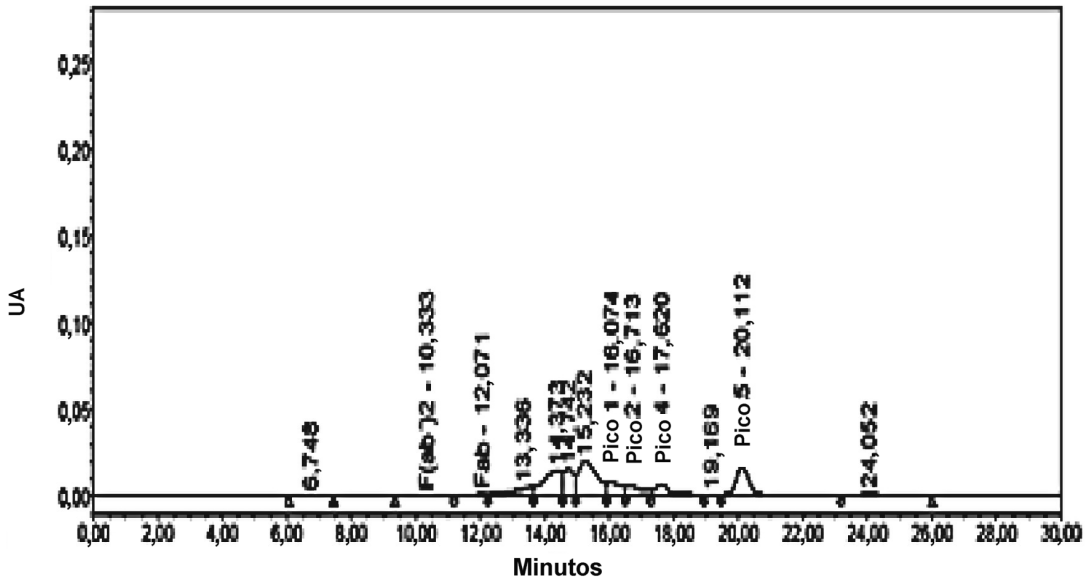


FIGURA 8c

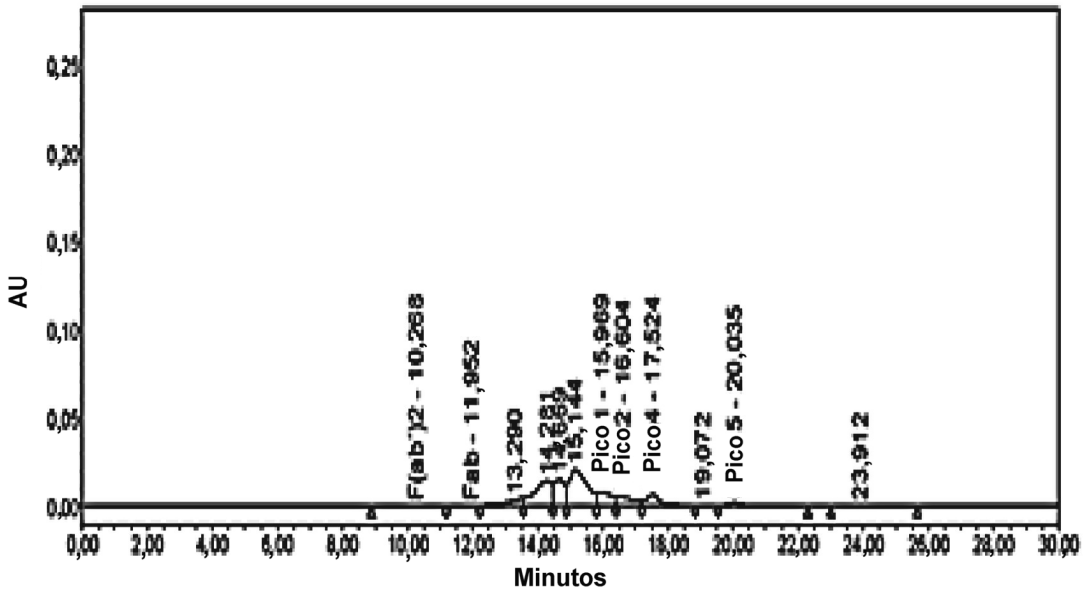


FIGURA 8d

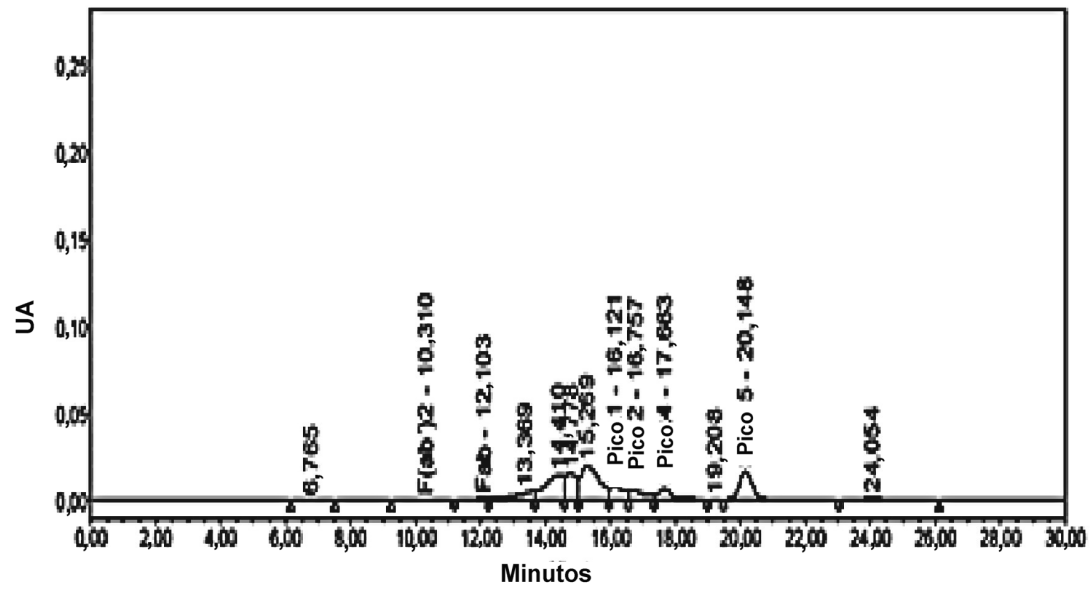


FIGURA 8e

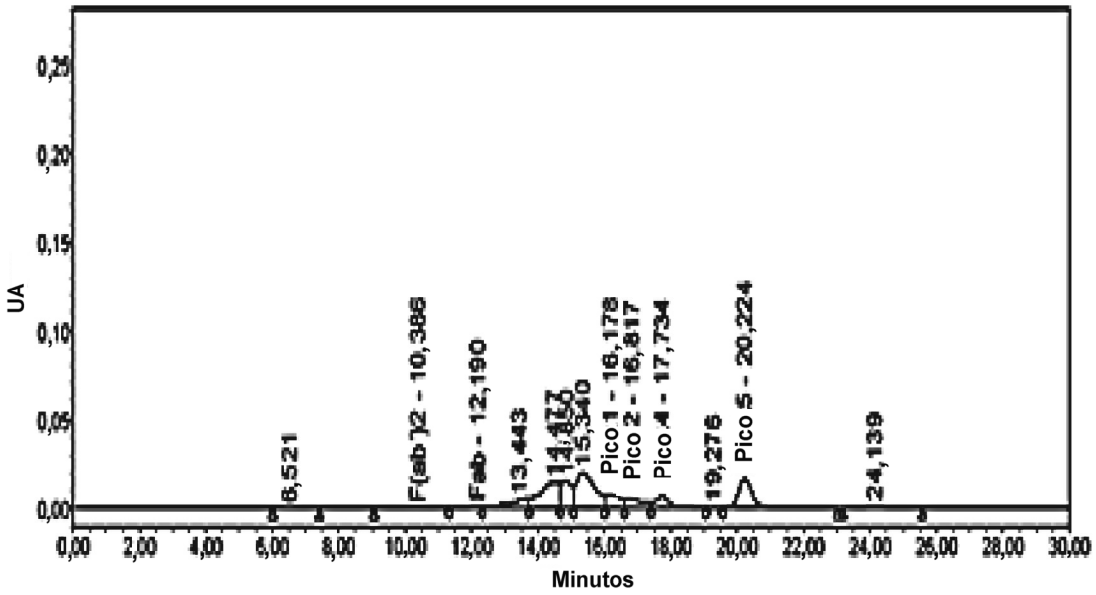


FIGURA 8f

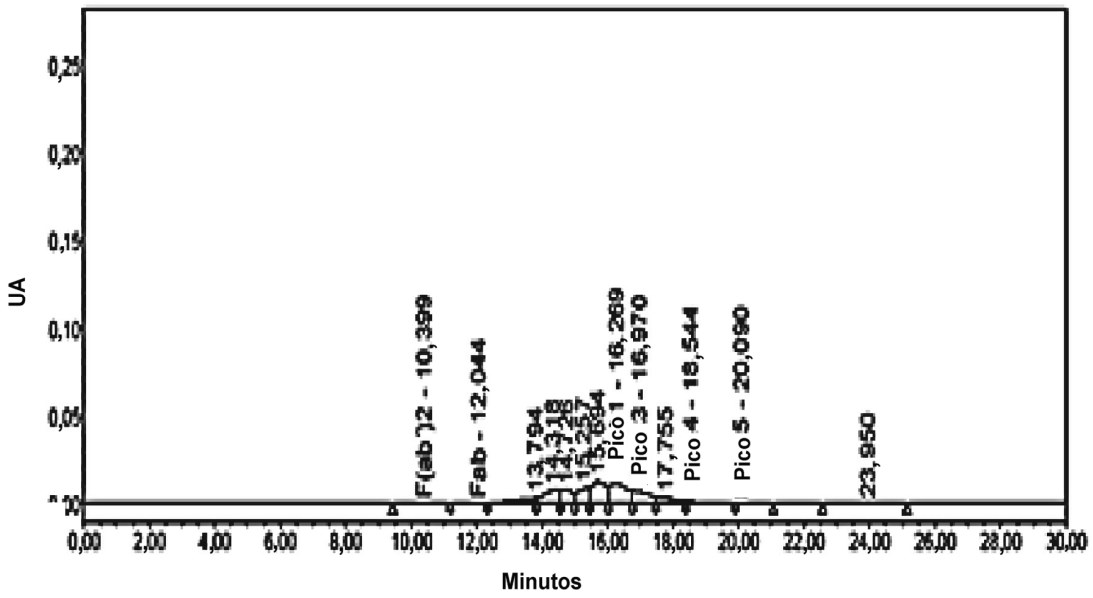
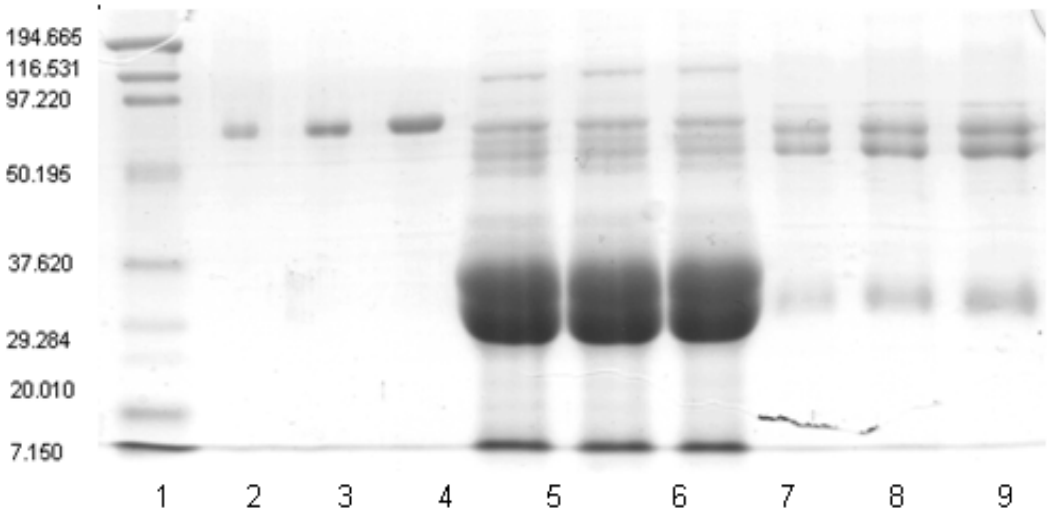


FIGURA 9


194.665
116.531
97.220
50.195
37.620
29.284
20.010
7.150
1
2
3
4
5
6
7
8
9