

PATENTE DE INVENCION

Ref: Your ref: 10062.



11 OCT. 1951

345979

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la preparaci3n de un agente proteico anti-inmunitario".

=====

Solicitante: NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, entidad inglesa, residente en Kingsgate House, 66-74 Victoria Street, Londres, S.W.1., Inglaterra.

=====

Este invento se relaciona con agentes anti-inmunitarios, 3tiles para prolongar la vida de los injertos hom3logos en mamiferos.

En la actualidad se dedica una atenci3n considerable a los m3todos para el trasplante o injer-

5.

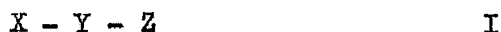
345979



- to con éxito de la piel u otros tejidos u órganos desde un donador sano a un receptor en el que las células en cuestión están deterioradas o enfermas de algún modo. Se comprueba sin embargo que existen invariablemente algún grado de incompatibilidad inmunológica entre el receptor y el donador y que el injerto o trasplante que generalmente resulta al aplicarlo, se deshecha o reusa en cuestión de pocos días. En un intento para reducir esta incompatibilidad, se ha propuesto la administración de agentes anti-inmunitarios, especialmente azatioprina (imidazol-6-mercapto-purina), pero estos agentes tienden a ser solamente efectivos en niveles o dosis tóxicas.

- Los agentes anti-inmunitarios proteínicos, sintéticos, se ha comprobado que tienen unas características más favorables actividad/toxicidad que los compuestos hasta la actualidad utilizados.

- Este invento proporciona nuevos compuestos proteínicos en los que una molécula de ribonucleasa se enlaza directa o indirectamente, a través de un agente proteínico de enlace a una molécula de proteína fisiológicamente innócuas. En el caso más sencillo utilizando un agente de enlace difuncional, los nuevos compuestos pueden representarse por una fórmula general



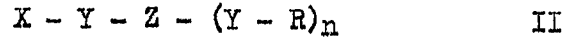
- En la que X representa ribonucleasa, Z representa la proteína fisiológicamente innócuas, e Y representa un enlace directo o residuo del agente químico de enlace.

El grupo Z puede además estar enlazado a través de otro grupo Y, a otros grupos X ó Z aumentando el tamaño de la molécula, pero conservando sin embargo la ac-

- 3 -
345979



tividad enzimática de la ribonucleasa de la que se deriva la molécula. Estos materiales de peso molecular superior, pueden representarse por una fórmula general.



5. en la que R representa un grupo X o un grupo Z y n representa un número entero de 1 a 3. Cuando n representa 0 el material es de la fórmula I anterior, y los materiales preferidos son aquellos en los que $n = 0$ ó 1.

10. Los agentes de enlace polifuncionales son también susceptibles de uso para unir entre sí las moléculas de proteína que proporcionan productos de fórmulas de estructura más completa, en la que se realiza el enlace cruzado.

15. En determinadas circunstancias, es también posible unir las moléculas de proteína juntas entre sí, directamente, utilizando un grupo funcional en cada molécula, por ejemplo haciendo reaccionar un grupo carboxilo activado en una molécula con un grupo amino de la otra, en presencia de, por ejemplo, una carbodi-imida para formar una amida, o con un grupo hidroxilo, para formar un éster. En
20. estos productos, el grupo Y de enlace, representa un enlace directo y cuando se forma un enlace amida, las dos moléculas proteínicas se unen una a otra por un enlace análogo que enlaza los ácidos amínicos individuales de cada molécula de proteína entre sí.

25. La ribonucleasa, con preferencia, pero no necesariamente, se deriva de la especie a que los compuestos de este invento han de administrarse. La ribonucleasa puede recuperarse de la orina u órganos internos y puede derivarse de orígenes bovinos o porcinos, por ejemplo re

345979



5. cuperarse del páncreas bovino que, en estos momentos, representa un origen útil de ribonucleasa en escala comercial. Se acepta que la ribonucleasa no exhibe una selectividad especial para las especies y los agentes anti-inmunitarios derivados de una ribonucleasa procedente de mamíferos, resultarán clínicamente aceptables en mamíferos distintos.

10. La otra mitad proteínica Z de los compuestos de este invento, ha de ser fisiológicamente inocua, es decir, ha de ser una proteína carente de actividad especial profiláctica o terapéutica y que pueda administrarse a seres en proporciones de dosificación clásica, por ejemplo 0,2 mg/kg. de peso del cuerpo, sin cambio apreciable en el metabolismo del individuo.

15. Desde el punto de vista médico, estas proteínas se considerarán normalmente como inertes aún cuando posean alguna actividad bacteriológica como resultado de su carácter proteínico. Los materiales proteínicos adecuados, incluyen las distintas albúminas, tales como la albúmina de huevo y la

20. albúmina de suero bovino, las globulinas que contienen globulina gamma bovina y hemoglobina, los colágenos solubles y los materiales gelatinosos. La verdadera ribonucleasa es también adecuada como segunda proteína para acoplarse a la primera molécula de ribonucleasa a través del grupo de enlace Y. La ribonucleasa tiene un peso molecular relativamente reducido para una proteína, alrededor de 14.000, y constituye una proteína fisiológicamente inocua bien conocida por ser rápidamente excretada

25. por el cuerpo de los ratones. La proteína Z puede considerarse como una proteína portadora para impedir que la

30.

345979



17 OCT. 1967

ribonucleasa se desprece. Los materiales proteínicos inadecuados, incluyen las distintas proteínas fisiológicamente activas tales como A.C.T.H. (hormona adreno corticortrófica) y los compuestos que contengan este cuerpo u otra actividad hormonal.

- 5.
- El grupo de enlace Y puede derivarse de cualquiera de los compuestos orgánicos simples fisiológicamente inertes corrientemente usados para enlazar entre sí moléculas de proteína activa. Corrientemente están constituidas por compuestos que contienen nitrógeno, y uno de los grupos de enlace más corriente para fines experimentales, es la 4,4'-bis-diazobencidina que se acopla con las demás moléculas en cada grupo azóico, como en un colorante azóico. Así, en el caso de las proteínas que contienen tirosina, tal como la ribonucleasa, se cree que la 4,4'-bis-diazobencidina se acopla al residuo del anillo de tirosina, en posición orto con respecto al grupo hidroxilo. Otros compuestos conocidos como adecuados para el enlace entre sí de moléculas de proteína y que pueden utilizarse para proporcionar el enlace Y en los compuestos de que se trata, incluyen: 1,3-difluor-4,6-dinitrobenzoceno, agentes de enlace preferido para productos indirectamente enlazados, toluen-2,4-di-isocianato, p-fenilendiamina 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-carbodi-imida metil p-tolueno sulfonato, N-etil-5-fenil-isoxazolio-3¹ sulfonato (reactivo K de Woodward) o cloruro cianúrico. Las carbodi-imidas son los agentes de enlace preferidos ya que permiten que las dos moléculas de proteína se enlacen entre sí directamente a través de uno o más enlaces amida. Estos productos no contienen
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

- 6 -
345979



grupos de enlace "anómalos" y se espera que sean más aceptables para el individuo que los recibe.

5. Los compuestos de este invento, pueden prepararse colocando juntas las dos moléculas de proteína X e Y en presencia del agente de acoplamiento Y en condiciones tales que la molécula X se acople a la molécula Z directa o indirectamente, a través de Y. Los compuestos preferidos de este invento, en los que X y Z representan proteínas distintas, son aquellos en los que una molécula X enlaza, a través de una molécula Y, a una molécula Z, por ejemplo de la fórmula I, y cuando Z es una albúmina, el producto tiene un peso molecular de 80.000 aproximadamente. Los productos de mayor peso molecular pueden obtenerse cuando más de una molécula X ó Z se acoplan juntas modificando la proporción de reactivos, y quizá también utilizando agentes de enlace trifuncionales. Los reactivos, idealmente, han de hallarse presentes en cantidades equimoleculares para productos de la fórmula I, pero a menudo es necesaria alguna desviación de estas cantidades ideales, para permitir las diferentes reactividades de X y Z en la reacción de acoplamiento.
- 10.
- 15.
- 20.

25. En el caso de usar la verdadera ribonucleasa como proteína Z fisiológicamente inócua, los compuestos preferidos son los de fórmula II en los que $n = 1$ preparados por la reacción de ribonucleasa y agente de enlace difuncional en una relación molar de 3:2.

30. En el caso de que el agente de acoplamiento sea la 4,4'-dis-diazobencidina, el acoplamiento en orto con el grupo hidroxilo en el residuo de tirosina, se realiza

345979



5. fácilmente en condiciones alcalinas, por ejemplo alrededor de pH 9 - 10. Estas condiciones alcalinas se prefieren también cuando se utiliza el difluordinitrobeneno, como agente de enlace, pero los demás agentes de enlace, antes citados, experimentan la reacción más fácilmente en solución neutra.

10. Los compuestos de este invento pueden separarse de los reactivos de peso molecular inferior, y de las gomas y resinas de peso molecular superior, por técnicas cromatográficas y por técnicas de filtración de gels utilizando los distintos "tamices moleculares" en la actualidad disponibles. Estos "tamices" pueden usarse para separar mezclas de componentes de pesos moleculares distintos y pueden obtenerse productos de fórmula I en estado de muestras cromatográficamente puras. Uno de estos tamices adecuados, es el Sephadex G-100 suministrado por Farmacia de Upsala, Suecia que separa la ribonucleasa sin reaccionar, de la ribonucleasa acoplada.

15. Los compuestos de este invento, se precipitan por el anticuerpo de la ribonucleasa, aún cuando los compuestos estén casi libres de ribonucleasa sin acoplar, la retención de la actividad enzimática, es un rasgo característico de los compuestos de este invento.

20.

25. Otros aspectos de este invento, incluyen composiciones farmacéuticas que comprendan un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable junto con compuestos anti-inmunitarios, como antes se describe, en los que una molécula de ribonucleasa se enlaza; por un agente de enlace proteínico, a una molécula de proteína fisiológicamente inerte. El método preferido de administración es

30.



345979

- la vía parenteral y el diluyente preferido es un diluyente inyectable, por ejemplo un suero fisiológico api rógeno. Otro nuevo aspecto de este invento, proporciona un método para prolongar la vida de los injertos homólo
5. gos en mamíferos, que comprende el administrar una composición farmacéutica tal como se ha definido, al individuo tratado, aproximadamente en el momento de introducir el injerto homólogo. El compuesto, con preferencia se introduce parenteralmente en el individuo, convenientemente por inyección intravenosa de una composición tal
10. como acaba de indicarse, pocas horas o días antes de introducir el injerto homólogo. Puede ser preciso administrar nuevas cantidades del compuesto, en el período que sigue al trasplante o injerto, cuando, en ausencia de
15. agente anti-inmunitario, se presenta normalmente el rechazo o expulsión de injerto. La necesidad para esta terapia de conservación puede evitarse por un régimen de inyección modificado, en el que las células del injerto homólogo a trasplantar, se introducen en el individuo en tratamiento en una o preferentemente dos ocasiones, aproximadamente al mismo tiempo que el agente anti-
20. -inmunitario. Se comprueba que siguiendo este tratamiento, el individuo tratado adquiere una tolerancia a la proteína extraña, de tal modo que existe una respuesta inmune despreciable cuando se realiza la trasplantación
25. o verdadero injerto.

Las proporciones típicas de dosificación de estos agentes anti-inmunitarios, son de 20-100 mg/kg. peso del cuerpo por ribonucleasa trimera, o sea, compuestos de

30. fórmula II en los que $n = 1$ y X, Z y R representan ribo-

345979



nucleasa y 300/600 mg/kg. de peso del cuerpo para ribonucleasa/albumina, o sea, compuesto de fórmula I.

En los ejemplos siguientes se facilita para aclarar los varios aspectos de este invento.

5. EJEMPLO 1 - Acoplamiento con 4,4'-bis-diazobencidina
=====

- Se prepara 4,4'-bis-diazobencidina (BDB) por diazotación de 45 mg. de bencidina con 36 mg. de nitrito sódico, en 10 cc. de ácido clorhídrico al 3%. Los reactivos se enfrían a 4°C. antes de mezclarse, y luego se mantienen a 7 - 8°C durante una hora. A continuación se añade 0,1 cc de la solución BDB a 2 moles de proteína disueltas en 5 cc. de amortiguador o solución tampón de glicina/NaOH/NaCl (0,8 M de glicina, 0,2 M NaCl y 0,2 M de NaOH) a 4°C. con agitación energética, evitando la formación de espuma. La proteína es una mezcla que contiene 10 mg. de ribonucleasa (RNasa) y 100 mg. de albumina de suero bovino (BSA). Al cabo de 10 minutos, se ajusta el pH a 5 con HCl N/1 y la mezcla se calienta a 37°C. durante 30 minutos, después de añadir un volumen igual de acetato tampón 0,1 M. Si se omite el caldeo, se forman burbujas de nitrógeno en el gel cromatográfico. La separación de la fracción proteínica se lleva a cabo en una columna Sephadex G100 de 50 x 2,5 cm., en NaCl 0,1 M. Se recoge el material sobrenadante y se calcula la concentración de RNasa y de proteína, en el complejo RNasa/BSA.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

Esta reacción de acoplamiento, se repite utilizando proporciones molares equivalentes de globulina gamma humana (HGG) y ovalbúmina (OA) para proporcionar complejos correspondientes RNasa/HGG y RNasa/OA.

30.

345979



- Además, se prepara un complejo RNasa/RNasa.(poli-RNasa) por el método general antes descrito, en el que se añaden 0,5 cc. de solución BDB a 100 mg. de RNasa. Todos los complejos se conservan a 4°C. En todos ellos,
5. las moléculas de proteína están enlazadas entre sí a través del sistema bis-diazobencidina.

EJEMPLO 2 - Acoplamiento con difluordinitrobenceno
=====

- Se disuelven 100 mg. de ribonucleasa pancreática bovina en 10 cc. de Na₂CO₃ 0,05 M y se conserva a 20°C. A esta solución se añaden 0,12 cc. de una solución al 1% de difluordinitrobenceno disuelto en metanol absoluto seco. La adición se hace rápidamente, con
10. energética agitación, para asegurar la mezcla rápida, y luego se deja la mezcla a 20°C durante una hora con lo cual el pH desciende a 4,5 por adición de ácido acético
15. 4M. El producto se cromatografía a continuación en una columna Sephadex G100 de 60 x 5 cm., equilibrada con NaCl 0,15 M. El cuerpo sobrenadante y una parte superior siguiente, correspondiente a un peso molecular de 40 a
20. 50.000, se recogen. Esta segunda parte superior contiene ribonucleasa trímica, o sea X-Y-X-Y-X en la que X representa ribonucleasa, e Y representa un grupo dinitrofenileno, y la parte superior se cree que contiene ribonucleasa pentámera y polímeras superiores. Las dos muestras
25. se concentran por ultrafiltración y se ensayan para su actividad anti-inmunitaria.

- En otros experimentos se disuelven 100 mg. de albúmina de suero bovino y 10 mg. de ribonucleasa de jugo pancreático bovino en 11 cc. de carbonato sódico al que
30. se le agrega 0,4 cc. de solución de difluordinitrobenceno-



345979 11 OCT. 1967

- no. El producto se separa nuevamente en una columna Sephadex G 100 y la parte superior se recoge dando un producto de albúmina ribonucleasa. Empleando 55 mg. de globulina gamma bovina, en lugar de albúmina se prepara en forma similar un complejo de globulina ribonucleasa. Los complejos se comprueban con respecto a su actividad anti-inmunitaria. En todos estos complejos las moléculas se enlazan entre sí a través del sistema de anillo dinitrofenileno.
- 5.
10. EJEMPLO 3 - Acoplamiento con toliilen-2,4-di-isocianato
=====
- 100 mg. de albúmina de suero bovino se disuelve en 5 cc. de fosfato 0,1 M amortiguador de un pH de 7, y se enfrían a 15°C. Se añaden 0,17 cc. de toliilen-2,4-diisocianato, y la mezcla se agita sin formar espuma durante 3 horas. A continuación se agregan 5 cc. de carbonato sódico, 0,15 M que contengan 10 mg. de ribonucleasa de jugo pancreático bovino, y la mezcla se agita durante otras dos horas. La mezcla se enfría a continuación a 4°C. y se separan los cristales de diisocianato solidificados y no utilizados. La solución sobrenadante, se ajusta a un pH de 7 con ácido acético y se separan por cromatografía Sephadex, como se describe en los ejemplos 1 y 2; la parte superior se recoge y se concentra para proporcionar un complejo albúmina/ribonucleasa, que se ensaya. Se realiza un experimento análogo utilizando 55 mg. de globulina gamma bovina, en lugar de albúmina, para proporcionar un complejo de globulina/ribonucleasa. En todos estos complejos, las moléculas de proteína se enlazan entre sí a través del sistema de anillo toliilénico.
- 15.
- 20.
- 25.
30. EJEMPLO 4 - Acoplamiento con reactivo Woodward's K
=====



345979

A una mezcla de 100 mg. de albúmina de suero bovino y 10 mg. de ribonucleasa de jugo pancreático bovino disuelta en 11 cc. de NaCl 0,2 M se añaden 4 mg de N-etil-fenilisoaxazolio-3-sulfonato (reactivo K de Woodward).

5. El pH se ajusta a 7,2 con NaOH, 1 N y la solución se agita durante 24 horas a la temperatura ambiente. El producto se cromatografía a continuación en Sephadex como se describe en los ejemplos 1 y 2 y la parte superior se concentra para dar un complejo albúmina/ribonucleasa. En otros experimentos, la albúmina se sustituye por 55 mg. de globulina gamma bovina, o 10 mg. de ribonucleasa, para proporcionar los complejos globulina/ribonucleasa y poliribonucleasa correspondientes. En todos estos complejos, las moléculas de proteína están enlazadas directamente como amidas.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 5 - Acoplamiento con carbodi-imida ionica
=====

- Se repite el método descrito en el ejemplo 3, utilizando 1,5 mg. de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil)-carbodi-imida metil-p-toluenosulfonato, en lugar del reactivo de Woodward, para dar complejos albúmina/ribonucleasa, globulina/ribonucleasa y poliribonucleasa. En todos estos complejos, las moléculas de proteína se enlazan directamente como amidas.
- 20.

EJEMPLO 6 - Acoplamiento con bis-diazo-p-fenilendiamina
=====

- Se repite el método descrito en el ejemplo 1 para el acoplamiento con bis-diazo-bencidina, utilizando una solución de bis-diazo-p-fenilendiamina de la misma concentración molar, que se prepara por diazotación con nitrito sódico en HCl de la mitad de la cantidad de p-fenilendiamina con respecto a la de bencidina, para proporcionar
- 25.
- 30.

345979



cionar complejos albúmina/ribonucleasa, globulina/ribonucleasa y poliribonucleasa. En todos estos complejos, las moléculas de proteína se enlazan entre sí a través del sistema de anillo fenilénico.

5. Caracterización de los complejos -

Todas las preparaciones obtenidas utilizando algún agente de enlace contienen actividad proteínica y de ribonucleasa. Las preparadas con carbodi-imidáica, o Woodward's K o toluendisocianato, son incoloras. Los complejos obtenidos con reactivos diazoicos son amarillo-rojizos, y con difluordinitrobenceno, amarillo-verdosos.

10.

Los espectros tienen todas absorciones máximas a 280 mμ, a causa del contenido de ácido amino aromático, pero pueden tener también absorción debida al agente de acoplamiento.

15.

<u>Agente de acoplamiento</u>	<u>Máxima mμ</u>	<u>Mínima mμ</u>
carbodi-imida	280	
Woodward's K	280	
toluendisocianato	280	
difluordinitrobenceno	280	310
	350	390
	410	
bisdiazobencidina y	280	335
bisdiazo-p-fenilendiamina	400	
		relación 350/400 extinción
difluordinitrobenceno		1.8
reactivos diazoicos		0.74
otros reactivos usados		1.0



345979

11 OCT. 1967

- La actividad enzimática de los complejos preparados en los ejemplos 1 a 6, se confirma el siguiente análisis de ensayo de difusión en gel. Se llenan discos de poliestireno, de Petri, hasta una profundidad o espesor de 3 mm., con una solución de agar al 1 % (Ionagar nº 3) a la que se ha añadido, después de enfriar a 45°C, una décima del volumen de una solución al 2 % de levadura comercial RNA en acetato 0,1 M tampón de un pH de 5. En el gel después del cuajado, se practican orificios de fondo cerrado, y se llenan con las muestras sometidas a ensayo. Las placas se incuban durante 18 horas a 37°C, y la RNA sin dirigir, se precipita en el gel llenando los discos o placas con una solución al 0,24 % de acetato de uranio en ácido tricloroacético al 1,25 %. Los diámetros de las zonas claras alrededor de los orificios, se miden y se utilizan para calcular la relación de enzima en las muestras desconocidas y normales. El diámetro de las zonas es proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de enzima y se usa para comparar las muestras desconocidas con RNasa normales.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

Utilizando este ensayo, la concentración enzimática de todas las preparaciones complejas, antes descritas, se ajusta para que sea equivalente a 30 g/cc. RNasa de jugo pancreático bovino (Koch-ligero 4x recristalizado).

25. Respuestas anticuerpos

- Se inmunizan intravenosamente ratones de cepa A, con 0,1 cc. de hematies al 10 % de carnero, 0,01 cc. de vacuna TAB, ó 0,1 cc. de hematies de rata al 50 % marcados con ⁵¹Cr. Los animales se sangran a los 6 días y el suero se separa. Se miden las hemaglutininas por dilucio
- 30.



nes en serie en volúmenes de suero salino, tamponado con barbitona, de 0,1 cc. del suero, en tubos de poliestireno de 5 x 35 mm. A cada tubo se le añaden 0,02 cc. de hematies de carnero al 2 %. Después de haber leído las titulaciones de hemaglutinina, se añade a cada tubo 1,5 MHD de complemento de cobaya, absorvido con hematies de carnero. Al cabo de dos horas de incubación a 37°C, se registran las titulaciones de hemolisina.

10. La eliminación inmune de las células de ratones marcados se descubre por medición de la radioactividad en muestras de sangre diarias, por punción retro-orbital. Las aglutininas antitífóideas H se calculan 8 días después de la inmunización.

Anticuerpos para hematies de carnero

15. Cuando se administran intravenosamente una dosis sencilla de 0,4 mg. de BSA-RNasa en solución salina antes del antígeno, se comprueba que existe un efecto sobre la respuesta a las células de carnero y TAB, pero no a las células de ratón. Existe un período óptimo de alrededor de 10 a 20 horas antes del antígeno, en el que proporcionan el BSA/RNasa. Utilizando una inyección sencilla de RNasa/BSA 16 horas antes de las células de carnero, las titulaciones de hemaglutinina hemoaglutinina y hemolisina, son sólo justamente elevadas como en los animales que no se han preparado con antígeno. (Ver Tabla I siguiente). Con la inyección de ribonucleasa sin acoplar no se presenta efecto sobre la respuesta inmune.

20. Que las titulaciones reducidas obtenidas a los 6 días no se deben a retrasos con las respuestas anticuerpo, se demuestra en la Tabla II siguiente en la que se

345979



5. observa que las titulaciones máximas en animales tratados y de control, se ve que se presentan al mismo tiempo después de la oposición antigénica. Utilizando un intervalo de 16 horas entre el RNasa/complejo y el antígeno, se obtienen resultados análogos utilizando antígeno de células de carnero con otras preparaciones de complejos de RNasa. Se resumen en la Tabla 4 siguiente.

Anticuerpos para fiebre tifoidea y antígeno

10. El efecto de una inyección sencilla de BSA-RNasa en solución salina, sobre la respuesta a la vacuna TAB, se indican en la Tabla 3 siguiente. Lo mismo que en las células de carnero, existe una supresión casi completa de respuesta anticuerpos cuando la inyección se administra 16 horas antes del antígeno, y un efecto menos significativo cuando se administra 1 ó 24 horas antes del antígeno.

Eliminación de hematíes de ratón

20. Una dosis sencilla de cualquiera de los complejos, no fué suficiente para impedir la eliminación inmune de hematíes de ratón, ni para impedir la aparición de anticuerpos en 6 días. Sin embargo la supresión se presentó cuando se usaron dosis múltiples de complejos RNasa.

345979



T A B L A 1

<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones</u>			
		<u>hemoaglutinina</u>		<u>hemolisina</u>	
			<u>S.E.</u>		<u>S.E.</u>
hematies carnero	20	812	94	1420	126
ninguno	20	9,2	3,7	8	-
id. BDB acoplado con RNasa/BSA	20	9,4	2,9	8	-

T A B L A 2

<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones</u>		
		<u>hemoaglutinina</u>		
		<u>día 6</u>	<u>día 9</u>	<u>día 12</u>
hematies carnero	20	812	1050	795
" "				
BDB acoplado con RNasa/BSA	20	3,6	4,1	3,1

T A B L A 3

<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones</u>	
		<u>aglutinina Anti S typhi H</u>	<u>S.E.</u>
Ninguno	10	1,75	0,25
TAB	20	25,0	3,8
TAB RNasa/BSA	30	1,78	0,27

T A B L A 4

<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones</u>	
		<u>hemoaglutinina</u>	
Ninguno	20	10,2	4,1
hematies carnero solo	20	850	84
" " y RNasa (1.0 mg.)	20	920	92

345979



TABLA 4 (continuación)

<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones hemoaglutinina</u>	
hematíes carnero y BDB enlazado con RNasa/BSA (0,8 mg)	40	9,6	4,8
hematíes carnero y BDB enlazadas con RNasa/HGG (0,83 mg)	20	11,6	4,3
hematíes carnero y BDB enlazadas con RNasa/OA (0,78 mg)	10	9,5	4,0
hematíes carnero y BDB enlazado con poli-RNasa (0,3 mg)	30	8,6	4,6
hematíes carnero y poli-RNasa (2 mg)			
enlazado usando p-fenilendiamina	10	11,2	2,4
enlazado usando di-fluordinitrobenceno	10	3,0	0,8
enlazado usando carbodi-imida iónica	8	18,6	7,1
enlazado usando reactivo Woodward K	10	12,0	2,9
hematíes de carnero y Albúmina/RNasa (4 mg)			
enlazado usando p-fenilendiamina	10	9,6	1,9
enlazado usando di-fluordinitrobenceno	10	2,8	1,4
enlazado usando carbodi-imida iónica	10	23,3	4,6
enlazado usando reactivo Woodward K	10	14,8	6,7
enlazado usando toli lendiisocianato	9	45,5	8,8

345979

TABLA 4 (Continuación)



<u>Tratamiento</u>	<u>Nº ratones</u>	<u>Media geométrica titulaciones hemoaglutinina</u>	
hematíes de carnero y globulina/RNasa (4 mg)			
enlazado usando p-fenilendiamina	10	16,2	6,0
enlazado usando difluordinitrobenceno	28	6,6	2,3
enlazado usando reactivo Woodward's K	6	21,0	8,4
enlazado usando toliendiiisocianato	8	48	10,5

Trabajo injerto piel

- (a) - Se suministran dos inyecciones intravenosas de 2,5 mg. de complejo ribonucleasa y albúmina de suero bovino enlazados utilizando difluordinitrobenceno con soluciones fisiológicas salinas, a cepas "A" de ratones, cada dos días después de dos inyecciones intravenosas de células nodales de linfa C₃H con 4 días de intervalo entre ellas. Luego los animales se ensayan para la tolerancia, aplicando un injerto de piel C₃H.
5. No se suministra otro tratamiento con el injerto. Normalmente esta combinación de cepas da por resultado el desprendimiento del injerto en 8,5 días ± 0,5. Los animales tratados retienen, todos, los injertos durante 20 días, 2/10 durante 25 días y 1/10 parece ser más tolerante con el injerto, todavía sano después de 26 días.
- 10.
- 15.

(b) - En una combinación análoga de piel de ratón en la que los injertos se desprendieron en 8 días,

- 20 -
345979



11 OCT. 1961

- 20 animales recibieron inyecciones intravenosas de complejo de albúmina de suero bovino/ribonucleasa, preparado con BDB (25 mg. en solución fisiológica en cada inyección) diariamente durante 12 días. 16/20 injertos sobrevivieron 20 días y 4 sobrevivieron 8 meses y medio, a los que se mataron los animales y se examinaron histológicamente los injertos. Estos estaban casi normales sin evidencia de desprendimiento.
5. (c) - Cuatro días antes de transplantar los riñones en perros, se suministra una inyección intravenodesa/complejo de albúmina de suero bovino/ribonucleasa enlazados con BDB. El material se inyecta en suero salino fisiológico a razón de 170 mg/kg. de peso del cuerpo. Los 6 perros sobrevivieron durante más de dos semanas con buena función renal, muriendo de enfermedad sin evidencia de desprendimiento.- o infecciones quirúrgicas, a los 15-17 días. Sólo tres perros mostraron evidencia de desprendimiento. Solamente 1/9 de los perros de control no acusaron desprendimiento de su riñón durante 6 días.
10. (d) - Cuatro días antes del injerto de riñón y el día del injerto, se administra a los ratones preparados, complejo de albúmina de suero bovino/ribonucleasa, o complejo de poliribonucleasa, enlazados por BDB,
15. en dosis que, en el caso de la poliribonucleasa suprimían las respuestas a la hemaglutinina de las células de carnero, casi por completo, y en el caso de complejo de albúmina, alrededor del 60 %. Los ratones tratados con complejo de albúmina, no desprendían los riñones en menos de 16 días, pero todos los desprendían
- 20.
- 25.
- 30.

- 21 -
345979



a los 18 días. Los otros grupos de ratones sobrevivieron 19, 22, 22 y 42 días. Todos los injertos de control se desprenden 8 días después del trasplante.

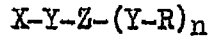
- N O T A -

5. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.
10. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente presentada en Inglaterra con fecha 12 de octubre de 1966 y bajo el número 45695/66; acogándose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN AGENTE PROTEINICO ANTI-INMUNITARIO"; caracterizándose por lo siguiente:
20. 1ª.- "Procedimiento para la preparación de un agente proteínico anti-inmunitario", caracterizado por que se hace reaccionar una ribonucleasa con una proteína fisiológicamente inocua, en presencia de un agente proteínico de enlace, de manera que la ribonucleasa se enlace directa o indirectamente, a través del agente de enlace proteínico, a la proteína fisiológicamente activa.
25. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el agente proteínico de enlace es difuncional y las proporciones molares de los reactivos
- 30.

- 22 -
34597941 OCT

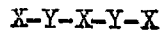


son tales que el producto resultante tenga una fórmula general



5. en la que X representa ribonucleasa, Z representa la proteína fisiológicamente inocua, R representa un grupo X ó Z, Y representa un enlace directo o el residuo del agente proteínico de enlace, y n es 0 ó 1.

10. 3a.- Procedimiento según la reivindicación 2a, caracterizado porque como reactivos se emplean ribonucleasa y el agente proteínico de enlace está presente en una relación molar que proporciona un producto trimero de ribonucleasa, de fórmula



en la que X e Y tienen los significados indicados mas arriba.

15. 4a.- Procedimiento según la reivindicación 2a, caracterizado porque como reactivos se emplean ribonucleasa, una albúmina o una globulina y el agente proteínico de enlace está presente en una relación molar que proporciona un producto, de fórmula



20. en la que X e Y tienen los significados indicados mas arriba, y Z representa una albúmina o globulina.

5a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque como ribonucleasa se emplea una ribonucleasa pancreática de orina.

25. 6a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque como

- 23 -
345979



proteína fisiológicamente inocua se emplea albúmina de suero bovino.

5. 7a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque como agente proteínico de enlace se emplea uno elegido del grupo consistente en 1,3-difluor-4,6-dinitrobenceno; 4,4'-diazobencidina; p-fenilendiamina; tolileno-diisocianato; 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-carbodiimida p-tolueno sulfonato y N-etil-5-fenil-iso-oxazolino-3' sulfonato reactivo Woodward K.
- 10.

8a.- "Procedimiento para la preparación de un agente proteínico anti-inmunitario", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

15. Esta memoria consta de 23 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY
P. P. Firmado en Madrid a 14 de Octubre de 1957