

388539

P.- 47.118

Case A 347

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE	<u>C12</u>
SUBCLASE	<u>K</u>



18 MAR 1972

Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad / de nacionalidad británica

con domicilio en 183-193 Euston Road, Londres, Inglaterra

por: " UN METODO DE PREPARACION DE UN SUERO ANTILINFOCITICO
INMUNOSUPRESIVO NO TOXICO"

(Clase Internacional C12k)

388539



La presente invención se refiere a extractos de linfocitos, y en particular a extractos de linfocitos que son adecuados para la producción de antisueros inmunosupresores no-tóxicos, a partir de los cuales puede aislarse la inmunoglobulina G antilinfocítica inmunosupresora no-tóxica (A.L.G.).

Las propiedades de los antisueros inmunosupresores, especialmente de los sueros antilinfocíticos (A.L.S.), han sido estudiadas durante algún tiempo en conexión con el problema del rechazo de los homoinjertos en la cirugía de transplante. Este rechazo se debe a la incompatibilidad inmunológica entre el receptor y el donante del homoinjerto, y los intentos para combatir este fenómeno han implicado el apareamiento de tejidos "tissue matching" y la administración de ciertas drogas inmunosupresoras.

Se ha encontrado que el A.L.S., que se produce en los mamíferos como respuesta a la introducción parenteral de linfocitos o antígenos de linfocitos, suprime el rechazo de homoinjertos en los mamíferos. Se ha ensayado A.L.S. procedente de cierto número de fuentes en diversos animales, y un problema que ha surgido es que tipos particulares de A.L.S. poseen ciertas actividades indeseables y a menudo tóxicas, tales como actividades de anticuerpo contra los glóbulos rojos y las plaquetas de la sangre, además de su acción inmunosupresora.

Se ha pensado que estos efectos secundarios adversos están relacionados con los tejidos. Timocitos de roedores y humanos (es decir, linfocitos del timo), fragmentos subcelulares y especialmente las membranas ce-



lulares de tales timocitos, y extractos solubles de tales timocitos, y en particular el extracto específico conocido como timosina, se han utilizado para producir antisue-
ros inmunosupresores que con no-tóxicos. Análogamente, se
5 ha utilizado de este modo timosina de ternera.

Las cantidades de linfocitos disponibles a partir de los timos no son, sin embargo, suficientes para la producción comercial económica de antisue-
ros inmunosupresores. Los linfocitos humanos más fácilmente disponi-
10 bles son los que proceden de la sangre humana, pero los antisue-
ros inmunosupresores producidos contra tales células e incluso las membranas de tales células son tóxicos, y en particular ocasionan una reducción sustancial en el
número de glóbulos rojos y plaquetas de la sangre del ani-
15 mal al que se administran, por ejemplo, por aglutinación,
lisis y otros mecanismos.

Se ha encontrado ahora que pueden utilizarse extractos solubles de linfocitos de la sangre humana como fuente de inmunógenos para producir un A.L.S. immuno-
20 supresores a partir del cual puede aislarse un A.L.G. immuno-
supresor, ambos de los cuales están desprovistos de las propiedades tóxicas normalmente características del A.D.S. producido para los extractos de partículas de linfocitos de la sangre humana o para las células totales.

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona por tanto una preparación estéril adecuada para producir antisuero antolinfocítico no-tóxico e inmunosupre-
sivo en un mamífero diferente del hombre que comprende un extracto inmunogénico soluble de linfocitos de sangre hu-
30 mana, siendo dicho extracto isotónico con la sangre del

388539

10 14



mamífero a utilizar.

Una forma particularmente valiosa de esta preparación es un extracto inmunogénico soluble y estéril de linfocitos de sangre humana que comprende fundamentalmente una mezcla de componentes macromoleculares cada uno de los cuales tiene un peso molecular menor de 1.000.000 y de mayor de 10.000, teniendo la mezcla un contenido de proteínas comprendida entre 50% y 100%, un contenido de lípidos inferior a 30% y preferiblemente inferior a 10%, y un contenido de hidratos de carbono inferior a 20%, expresándose los porcentajes en peso referidos al peso seco del extracto con exclusión de sales. En este sentido, el término "sales" significa sustancias componentes del extracto, cada una de las cuales tiene un peso molecular menor de 5.000.

Los valores de peso molecular y de composición porcentual arriba citados están sometidos a variación dentro de los límites indicados debido a factores tales como el estado de salud y la edad de la persona, o a las condiciones de un cultivo de células a partir del que se obtienen los linfocitos de la sangre. Ventajosamente, el peso molecular de los componentes macromoleculares están comprendido entre 10.000 y 200.000, siendo preferiblemente inferior a 100.000, por ejemplo, aproximadamente 60.000.

Tal como se utiliza aquí con referencia a A.L.S. ó A.L.G., el término "inmunosupresor" significa que tiene actitud para reducir la intensidad de la reacción de un organismo contra un tejido incompatible, esto es un tejido extraño o el tejido del propio organismo cuando éste se hace incompatible; así, el término "inmunosupresión"

388539



5 tiene por objeto incluir específicamente la prolongación de la vida de los injertos, especialmente los homoinjertos, consecutiva a la cirugía de transplante, y también el tratamiento de enfermedades de auto-inmunización tales como la oftalmía simpática.

10 Tal como se utiliza aquí con referencia a A.L.S. ó A.L.G., el término "no-tóxico" significa que el A.L.S. ó A.L.G. produce poca o ninguna aglutinación cuando se mezcla con los glóbulos rojos de la sangre humana, y no produce hemorragia alguna y poco o ningún descenso en el recuento de plaquetas en los ratones a las 18 horas de la inyección intraperitoneal de 1 ml del A.L.S. ó A.L.G.

15 El extracto antigénico es "soluble" en el sentido de que 10 mg en 1 ml de solución acuosa de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen forman una solución clara a simple vista. Es sumamente preferible que el extracto no contenga partícula alguna de tamaño mayor que 0,22 micras; esto se puede conseguir fácilmente por centrifugación a 100.000 g durante 30 minutos, y por paso a través de un 20 filtro Millipore GS (marca comercial registrada) con un tamaño de poro de 0,22 micras, aunque debe observarse que generalmente la centrifugación, en las condiciones arriba especificadas, es suficiente por sí misma para conseguir la eliminación de cualesquiera partículas de tamaño mayor 25 de 0,22 micras.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona también un método para preparar un extracto inmunogénico estéril, soluble, de linfocitos de sangre humana como se ha definido anteriormente en esta memoria que 30 comprende destruir por lisis los linfocitos y aislar el

388539



extracto soluble del producto resultante de la lisis, y hacer el extracto estéril e isotónico con la sangre del mamífero a utilizar.

5 Una fuente adecuada de linfocitos de la sangre humana puede ser un conjunto de linfocitos cultivados obtenidos originalmente a partir de sangre fresca, y cultivados luego en un medio nutriente apropiado hasta que son requeridos. Una característica particularmente ventajosa de la presente invención, no obstante, es que los linfocitos de la sangre a utilizar pueden aislarse fácilmente
10 a partir de sangre humana fresca, una fuente que puede conseguirse con bastante facilidad. Esto puede hacerse de cualquier manera conocida, pero convenientemente la sangre se trata con citrato, se recalifica y se desfibrina antes de la sedimentación de los eritrocitos. Se separan
15 luego los linfocitos del sobrenadante, y se eliminan los glóbulos rojos residuales que puedan quedar.

La lisis de los linfocitos puede llevarse a cabo por cualquier técnica convencional para lisis de
20 células, incluyendo la lisis mecánica, por ejemplo mediante uso de ondas sonoras ultrasónicas o cavitación intracelular para conseguir la ruptura de las células. Se prefiere, sin embargo, efectuar la lisis de los linfocitos mediante el uso de agentes que actúen fisicoquímicamente,
25 por ejemplo tampones hipertónicos, y agitar luego mecánicamente el producto resultante de la lisis para dispersarlo antes de aislar el extracto; o por el uso de agentes que actúen fisicoquímicamente, por ejemplo, tampones hipotónicos, en conjunción con agitación mecánica que ayu-
30 de a la lisis.



Así, desde el punto de vista de la comodidad de fabricación, cantidad de carga y calidad del producto, se prefiere efectuar la lisis con soluciones tampón acuosas hipertónicas o hipotónicas. Más específicamente la lisis hipotónica o hipertónica comprende la suspensión de los linfocitos en un tampón acuoso hipotónico o hipertónico respectivamente y romper por cizallamiento los restos celulares con un homegenizador adecuado, por ejemplo un homogenizador Dounce (Jencons Ltd., Londres) utilizando 50 a 100 carreras alternativas del pistón. Ocasionalmente, el homogenizador Dounce puede resultar ineficaz para producir una desintegración satisfactoria de los restos celulares, en cuyo caso puede probarse otro homogenizador. En tales casos, se ha encontrado que el homogenizador Silverson (Silverson Machines Ltd., Londres) es generalmente satisfactorio si se utiliza durante aproximadamente 2 minutos a velocidad intermedia.

Puede emplearse cualquier tampón conocido en la técnica como medio adecuado para la lisis hipotónica o hipertónica, pero el pH de cualquier tampón utilizado es preferiblemente de aproximadamente 7,5. Tampones particularmente adecuados son los indicados en los Ejemplos que se dan más adelante.

La lisis utilizando la técnica ultrasónica puede conseguirse de la manera descrita en la bibliografía (Ref. 8). Esto implica esencialmente someter una suspensión de los linfocitos en un tampón acuoso a ondas ultrasónicas en un oscilador ultrasónico durante un período de tiempo que varía entre 1 y 30 minutos.

Análogamente, la lisis utilizando cavitación

388539



intracelular puede llevarse a cabo de una manera conocida, por ejemplo, sometiendo una suspensión de los linfocitos en un tampón acuoso de un pH aproximado de 7,6, a una alta presión de nitrógeno, por ejemplo entre 35 y 70 kg/cm², pero preferiblemente a 56 kg/cm², en un recipiente de presión construido de acero, conocido también como bomba de nitrógeno, seguido por retirada de la presión para ocasionar así la ruptura de los linfocitos.

Los linfocitos pueden someterse a lisis también tratándolos con una solución acuosa de una sal de tiocianato de amonio o de un metal alcalino, preferiblemente una solución 1,3 a 3 M de tiocianato potásico, aunque la sal sódica es también de valor particular, La lisis de las células se consigue inmediatamente, dando una suspensión muy viscosa que puede diluirse luego con una solución acuosa de cloruro sódico y dispersarse utilizando un homogenizador.

En el transcurso de los procedimientos implicados en la lisis de los linfocitos y etapas subsiguientes de aislamiento del extracto, se mantiene una temperatura baja con objeto de evitar reacciones secundarias y la consiguiente pérdida de material, por ejemplo por degradación enzimática. Se ha encontrado conveniente una temperatura comprendida entre 0° y 10°C, preferiblemente aproximadamente 4°C.

A continuación de la lisis de los linfocitos humanos, es necesario aislar el extracto soluble. Esto lleva consigo separar el material soluble de la materia insoluble en el producto resultante de la lisis, y en los casos en que se ha utilizado en la lisis una sal de tiocia-



nato, entonces la etapa de aislamiento incluye adicionalmente la eliminación del ion tiocianato por cualquier procedimiento clásico, debiendo entenderse que las referencias a "aislamiento" o a "aislar" el extracto tienen este significado.

Antes de utilizar el extracto para producir un A.L.S. en un mamífero distinto del hombre, es también necesario asegurarse de que el extracto es isotónico con la sangre de dicho mamífero, y que el extracto es estéril. Esto último puede conseguirse como una etapa separada de esterilización, o en virtud de una o más de las etapas implicadas en el propio procedimiento de aislamiento.

El aislamiento de la fracción soluble del producto resultante de la lisis puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica para la separación de material celular soluble a partir de restos celulares insolubles, pero preferiblemente por ultracentrifugación con o sin una filtración por membrana subsiguiente de la fracción soluble. La ultracentrifugación puede llevarse a cabo ventajosamente a 60.000 a 150.000 g, durante 20 a 50 minutos. De este modo, el material soluble del producto resultante de la lisis se separa de la materia en partículas constituida principalmente por membranas, núcleos y otras partículas subcelulares.

Si la ultracentrifugación no consigue la separación deseada del material soluble e insoluble del producto resultante de la lisis, entonces puede llevarse a cabo una separación ulterior por medio de filtración por membrana, por ejemplo utilizando una membrana Millipore GS (marca comercial) con un tamaño de poro de 0,22 micras.

388539



Este procedimiento elimina cualesquiera componentes residuales en partículas y es también efectivo para esterilizar el extracto.

Si se ha utilizado una sal de tiocianato en la lisis de las células, entonces el ion tiocianato se puede eliminar convenientemente por diálisis.

Si se ha utilizado un tampón hipertónico en la lisis de las células, entonces las sales que constituyen el tampón hipertónico pueden eliminarse convenientemente por diálisis. Es también útil, aunque no necesario, dializar la fracción soluble cuando se ha obtenido por lisis hipotónica para ajustar el contenido de sal de la fracción soluble. La diálisis tiene también la ventaja adicional de separar componentes de peso molecular bajo que no parecen contribuir a la inmunogenicidad del extracto final. La diálisis se lleva a cabo generalmente contra una solución acuosa de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen.

Como una etapa adicional y opcional, la fracción soluble puede concentrarse también por cualquier medio conocido, pero ventajosamente por ultrafiltración. En esta etapa, la eliminación de las proteínas de peso molecular bajo puede conseguirse también dependiendo del tamaño de poro de la membrana utilizada, no excediendo en ningún caso dicho tamaño de poro de un valor tal que se excluyan moléculas de peso molecular mayor de 10.000.

La etapa de filtración por membrana a que se ha hecho referencia arriba puede llevarse a cabo antes de la diálisis o concentración, si se emplean las últimas etapas y después de la centrifugación, pero ventajosamente después de estas etapas si las mismas producen trazas de



materia insoluble, y después del almacenamiento del extracto, si es necesario.

La naturaleza química del extracto soluble puede comprobarse por cualquier método conveniente. El contenido de proteínas puede estimarse a partir de la relación de la densidad óptica a 260 $m\mu$ a la densidad óptica a 280 $m\mu$ (Ref. 3), determinándose las densidades ópticas examinando diluciones adecuadas en un espectrofotómetro Unicam S.P. 800 (marca comercial registrada). Preferiblemente se determina utilizando el método de Lowry (Ref. 4) basado en la intensidad de la coloración azul obtenida por la reacción de la proteína con el reactivo utilizado en el método de Lowry. El contenido de lípidos puede estimarse a partir de la solubilidad en cloroformo de un hidrolizado ácido del extracto (Ref. 5). La hidrólisis ácida puede efectuarse convenientemente con ácido clorhídrico. El contenido de hidratos de carbono puede determinarse por el método de la antrona (Ref. 6) basado en la intensidad del color desarrollado en la reacción del hidrato de carbono con la antrona.

El peso molecular de los componentes macromoleculares del extracto, tal como se ha citado anteriormente, se determinó por estudios de ultracentrifugación para determinar el coeficiente de sedimentación y deduciendo un peso molecular empírico a partir de éste utilizando la ecuación de Halsall (Ref. 1).

En otro aspecto de esta invención se proporciona un A.L.S. inmunosupresor estéril, isotónico y no-tóxico producido contra un extracto inmunogénico soluble de linfocitos de sangre humana, como se ha descrito anterior-

388539

16



mente, en un mamífero distinto del hombre. Así, los extractos solubles pueden utilizarse para producir un A.L.S. inyectándolos en mamíferos, distintos del hombre, utilizando convenientemente un mamífero de los órdenes Perosodáctilos o Artiodáctilos, por ejemplo, ovejas, cabras, ganado vacuno, cerdos o caballos, por cualquier programa de inmunización conveniente. En particular, pueden utilizarse para inmunizar conejos o caballos de acuerdo con el programa de Lance (Ref. 7) que consiste en esencia en una inyección intramuscular del extracto en Coadyuvante Completo de Freund, esto es, una emulsión de agua en aceite de la fase de extracto líquido dispersado en un aceite mineral, por ejemplo aceite de parafina, que contiene también bacterias destruidas por el calor, seguida por una serie de cuatro inyecciones intravenosas, extendida a lo largo seis semanas. Pueden añadirse al antígeno antibióticos, particularmente estreptomycinina y polimixina, para reducir efectos secundarios adversos.

El A.L.S. producido en el mamífero inmunizado se obtiene separado la sangre y sometiendo a coagulación. A continuación de la separación del coágulo, puede inactivarse el antisuero, por ejemplo calentándolo a 50° a 65°C, a fin de inactivar cualesquiera enzimas que puedan ser capaces de degradar el A.L.S. y cualquier complemento que pueda interferir con el uso de y con los ensayos de la fracción de A.L.G.

El A.L.S. puede fraccionarse seguidamente para producir A.L.G., el cual comprende la mayor parte de la inmunoglobulina G del A.L.S. utilizando técnicas conocidas para el fraccionamiento de sueros.



El fraccionamiento puede verificarse por cualquier método conocido en la técnica para obtener inmunoglobulina a partir de antisueros. Numerosos métodos utilizados son aplicables para obtener inmunoglobulina G a partir de A.L.S. de la presente invención.

En general, el procedimiento de fraccionamiento implica separar las globulinas de las albúminas del A.L.S., eliminar las hemolisinas y hemaglutininas si están presentes, y aislar la inmunoglobulina G, aun cuando el fraccionamiento puede conseguirse también por técnicas de inmunoabsorción con lo cual, por ejemplo, se forma un complejo anticuerpo/antígeno y subsiguientemente se disocia, para dar el anticuerpo deseado, en la forma de inmunoglobulina G. Alternativamente, puede obtenerse directamente la inmunoglobulina G a partir de la fuente de sangre utilizando una técnica plasmaforética. La separación de las globulinas se efectúa convenientemente por fraccionamiento con sal, utilizando preferiblemente sulfato amónico o sódico. Las hemolisinas y hemaglutininas pueden eliminarse por absorción mediante estroma de los globulos rojos, por cargas o en una columna de granos de gel de agar que contienen el estroma. La inmunoglobulina G puede aislarse a partir de las globulinas, o directamente a partir del A.L.S. por una o más de varias técnicas conocidas, que incluyen técnicas electroforéticas tales como electrodecantación; centrifugación zonal; cromatografía de cambio de ion, por cargas o en una columna utilizando, por ejemplo, un cambiador de anión basado en polisacárido tal como DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex (nombre comercial, Pharmacia Ltd., Uppsala, Suecia); cromatografía de exclusión, por cargas

388539



o en una columna; cromatografía de partición utilizando geles inorgánicos tales como fosfato de calcio; precipitación selectiva de proteínas con ácido n-octanoico (ref. 15), o con alcohol (Ref. 17).

5 La forma usual de presentación como composición farmacéutica para propósitos terapéuticos de A.L.S. ó A.L.G. es una solución acuosa isotónica estéril de proteína, normalmente al 5-10% peso/volumen, y de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen, con inclusión de un estabilizador
10 tal como glicina. Otra forma de presentación es como polvo liofilizado que tiene los mismos aditivos, para su reconstitución con agua estéril inmediatamente antes de su empleo. La administración es generalmente por inyección intramuscular, o muy preferiblemente por infusión intra-
15 venosa después de cualquier dilución necesaria con solución salina isotónica. El campo de dosificación es normalmente de 3 a 20 mg de proteína por kg de peso corpóreo y por día. Así, es usual administrar desde aproximadamente 1 ml por día de la solución estéril definida arriba para
20 un niño; y hasta 15 ml por día de la solución para un adulto, con sujeción al criterio del médico de cabecera.

La presente invención proporciona, por tanto, una preparación estéril e isotónica de una inmunoglobulina G antilinfocítica no-tóxica e inmunosupresora, ob-
25 tenida por fraccionamiento de un suero antilinfocítico inmunosupresor y no-tóxico producido contra un extracto inmunogénico soluble de linfocitos de sangre humana en un mamífero distinto del hombre; así como los métodos descritos anteriormente en esta memoria para preparar dichos inmuno-
30 globulina G y antisuero.

388539



La presente invención proporciona también, en otros aspectos, el suero antilinfocítico y la inmunoglobulina G, siempre que se preparen por las técnicas descritas en esta memoria.

5 Con objeto de que pueda comprenderse más completamente la invención, se dan los ejemplos siguientes, puramente a modo de ilustración, por lo que no deben considerarse como limitantes del alcance de esta invención.

10 Ejemplo 1: Preparación de un extracto antigénico soluble de linfocitos de sangre humana por lisis hipotónica.

Se centrifugó sangre humana reciente a 1.000 g durante 30 minutos para obtener una masa parda ("buffy coat"), que comprende una capa de glóbulos blancos y plaquetas sobre la superficie de los glóbulos rojos. La masa parda se mezcló con citrato sódico para impedir la coagulación. Cuando fue preciso, se recalificaron 200 ml de la mezcla por adición de cloruro cálcico a fin de permitir
15 que se produjera la coagulación. Se separó mecánicamente el coágulo de fibrina, y se trató la suspensión de células con una mezcla de 50 ml de dextrana al 6% peso/volumen - (peso molecular 110.000), 10 ml de ácido etilenediaminotetraacético al 10% peso/volumen, y 0,238 g de heparina, durante una hora a la temperatura ambiente. Los eritrocitos se sedimentaron por este tratamiento, y el sobrenadante rico en leucocitos se hizo pasar a través de una columna de bolitas de poliestireno para aislar los linfocitos. Los glóbulos rojos residuales de la sangre se separaron por
25 adición de suficiente cantidad de suero de eritrocitos an-

15.3.71

388539



ti-humano de pollo para conseguir la aglutinación, seguido por centrifugación a baja velocidad. El 97% de las células resultantes eran linfocitos de pequeño tamaño, con una alta capacidad de vida (98%), como se demostró por la
5 exclusión de azul tripan, indicativa de que las membranas de las células eran todavía semi-permeables (Ref. 10). La preparación de linfocitos se examinó microscópicamente, encontrándose que estaba exenta de contaminación por plaquetas o glóbulos rojos de la sangre.

10 Una suspensión de las células, que contenía 5×10^9 linfocitos, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos, y la masa resultante se suspendió de nuevo en 20 ml de un tampón hipotónico acuoso frío (aproximadamente a 4°C) de pH 7,4, que contenía cloruro sódico 0,01 M, 2-amino-2-
15 (hidroximetil)-propano-1,3-diol 0,01 M, y cloruro magnésico 1,5 mM. Se dejó en reposo la suspensión a 4°C durante 30 minutos, y se transfirió luego a un homogenizador de vidrio pistón/cilindro (de Dounce) que ajustaba herméticamente, mantenido en un baño de hielo-agua. Se sometieron las
20 células a rotura por cizallamiento en el homogenizador hasta que se consiguió al menos un 80% de lisis, comprobándose el grado de lisis mediante toma de muestras y examen microscópico intermitentes. El producto resultante de la lisis de las células se centrifugó a 100.000 g durante 30
25 minutos, y se recogió el sobrenadante claro.

Tenía las siguientes características:

(i) Solubilidad: Era una solución clara cuando se examinaba a simple vista; permaneció claro cuando se concentró hasta 10 mg de proteína por ml, por ultrafiltración, reconstitución siguiente después de liofilización, y cuando se
30



- aumentó la concentración de cloruro sódico hasta 0,85% peso/volumen; y pasó a través de un filtro Millipore GS, lo que indicaba la ausencia de partículas que tuviesen un tamaño mayor que 0,22 micras.
- 5 (ii) Contenido de proteínas: Aproximadamente 52% referido al peso seco de sólidos con inclusión de sales, como se ha definido previamente. Esto se estimó por el método de Lowry (Ref. 4), en el que se midió la intensidad de color azul producido en un espectrofotómetro a 750 m μ .
- 10 (iii) Contenido el lípidos: Aproximadamente 7,4 % referido al peso seco de sólidos con inclusión de sales, como se ha definido previamente. Esto se estimó a partir de la solubilidad en cloroformo (Ref 5). Una muestra del extracto se hidrolizó en ácido clorhídrico N durante 2 horas a 100°C, se liofilizó el hidrolizado, y se extrajo el residuo con
- 15 una mezcla de cloroformo y metanol en la relación de 3 a 1 en volumen; la solución se extrajo luego con 1 volumen de agua, se liofilizó la fase de cloroformo y se peso el residuo.
- 20 (iv) Contenido de hidratos de carbono: Aproximadamente 1,3% referido al peso seco de sólidos con inclusión de sales, como se ha definido previamente. El contenido total de hidratos de carbono se midió por el método de la antrona - (Ref. 6); se trató una muestra con ácido sulfúrico del 85%
- 25 a 100°C durante 10 minutos en presencia de antrona, y se midió en un espectrofotómetro la intensidad del color desarrollado a 620 m μ .
- (v) Peso molecular: La mezcla de componentes tenía un peso molecular, determinado por estudios de ultracentrifugación (Ref. 1), situado principalmente alrededor de 100.000,
- 30

388539 1b



aunque había cierta cantidad de material de peso molecular mayor, llegando hasta 1.000.000 pero sin sobrepasar este valor.

5 (vi) Electroforesis del gel de acrilamida: Se comprobó que el extracto era una mezcla de muchas proteínas. Se separó en aproximadamente 20 bandas, aunque ninguna indicó un constituyente principal. Estos resultados se obtuvieron por los métodos de Davis y otros (Ref. 2).

10 Ejemplo 2: Preparación de un extracto antigénico soluble de linfocitos de sangre humana por extracción química.

Se aislaron linfocitos de sangre humana reciente por el método descrito en el Ejemplo 1.

15 La suspensión de los linfocitos así obtenida se enfrió a 4°C, y se trató con 1 volumen de solución acuosa 2 M de tiocianato potásico. Se formó inmediatamente un gel, y éste se dejó en reposo a 4°C durante una hora. El gel se dispersó luego en 4 volúmenes de solución salina normal tamponada con fosfato, utilizando un homogenizador
20 Silverson (marca comercial, Silverson Machines Ltd., Londres), y la suspensión se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos. Se eliminó el ion tiocianato por diálisis del sobrenadante contra solución salina tamponada con fosfato, y se
25 desechó cualquier precipitado formado. Finalmente, se filtró la solución a través de un filtro Millipore GS con un tamaño de poro de 0,22 micras, y se recogió el filtrado.

El filtrado tenía sustancialmente las mismas propiedades que el extracto del Ejemplo 1, excepto que
30 demostró tener un mayor contenido de proteínas.



Ejemplo 3: Preparación de inmunoglobulina G anti-humana
inmunosupresora no-tóxica.

5 Se utilizó un extracto antigénico soluble
de linfocitos de sangre humana del Ejemplo 1 ó del Ejem-
plo 2 para producir antisuero inmunosupresor antihumano
de conejo. Se inmunizaron conejos de Nueva Zelanda blan-
cos y de California de un peso comprendido entre 2,2 kg
y 3,0 kg de acuerdo con el programa de Lance. Se les ad-
ministró una inyección intramuscular (I.M.) del antígeno
10 a 10 mg/ml, a la que se habían añadido 100 unidades por
ml de estreptomocina y polimixina, en Coadyuvante Comple-
to de Freund (F.C.A.), la cual fue seguida por una serie
de cuatro inyecciones intravenosas (I.V.) de acuerdo con
15 el programa que se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Programa de Inyección

<u>Día</u>	<u>Antígeno</u>	<u>Sangría</u>
20 0	I.M., 0,5 ml + 0,5 ml FCA	-
14	I.V., 0,5 ml	-
21	I.V., 0,25 ml	10 ml
28	I.V., 0,25 ml	-
35	I.V., 0,5 ml	10 ml
25 46	-	15 - 20 ml

En cada sangría, la sangre extraída de los
animales se reunió, y se dejó coagular. El suero se inac-
tivó por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, y lue-
go se dejó enfriar. El fraccionamiento se efectuó prime-
30

388539



ro tratando dos veces con sulfato amónico para separar la mayor parte de la albúmina, seguido por absorción de las proteínas distintas de la inmunoglobulina G sobre DEAE-Sephadex.

5 El A.L.G. así obtenido tenía las siguientes características:

(i) Peso molecular: 160.000, determinado por el método de Halsall (Ref. 1); durante la ultracentrifugación, se observó que se sedimentaba un solo componente como fracción 7 S.

10 (ii) Toxicidad: (a) Se valoraron diluciones en serie del A.L.G. contra la aglutinación de glóbulos rojos de sangre humana (Ref. 10); a diluciones de proteína de hasta uno en veinticuatro, el A.L.G. (Originalmente 2% de proteínas en peso/volumen) aglutinaba los globulos rojos de la sangre,
15 humana.

(b) Se valoraron diluciones en serie del A.L.G. contra la aglutinación de las plaquetas de la sangre humana (Ref. 11); a diluciones de proteína de hasta 1 en 12, el A.L.G. (Originalmente 2% de proteínas en peso/volumen) aglutinaba las plaquetas de la sangre humana.
20

(c) Se inyectaron intraperitonealmente - muestras de 1 ml, que contenían 60 mg de A.L.G. (peso seco), en ratones blancos Suizos. Al cabo de 18 horas se prepararon extensiones de sangre y se sacrificaron los ratones.
25 Las extensiones de sangre mostraron un recuento normal de plaquetas cuando se examinaron al microscopio, y no se detectó hemorragia alguna después de la disección y examen de los ratones.

(iii) Citotoxicidad: Se ensayaron diluciones en serie de
30 A.L.G. con respecto a su actitud para atacar las membranas

388539

18



de linfocitos, haciéndolas permeables al azul de tripán, en presencia de complementos de cerdo de guinea (Ref. 12). A una dilución de 1 en 48, la solución de A.L.G. (originalmente al 2% de proteínas en peso/volumen) hizo el 50% de los linfocitos en el medio de ensayo permeables.

(iv) Inhibición de rosetas: Se examinaron diluciones en serie del A.L.G. en cuanto su actitud para inhibir la formación de rosetas de glóbulos rojos de oveja con linfocitos humanos (Ref. 13). A una dilución de 1 en 32.000, al A.L.G. (originalmente al 2% de proteínas en peso/volumen) inhibía la formación de rosetas en una proporción del 25%.

Ejemplo 4: Preparación de un extracto antigénico soluble de linfocitos de sangre humana por lisis hipotónica.

Se aislaron linfocitos de sangre humana reciente por el método descrito en el Ejemplo 1. La suspensión de células, que contenía 6×10^9 linfocitos, se sometió a la lisis por tratamiento hipotónico por el método del Ejemplo 1, y los restos celulares sólidos se separaron por centrifugación a 100.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante claro se recogió y se filtró a través de una membrana Millipore GS con un tamaño de poro de 0,22 micras. El filtrado se dializó contra solución salina tamponada con fosfato que comprendía una solución acuosa de una mezcla de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen, fosfato de disodio e hidrógeno anhidro al 0,107% peso/volumen y fosfato de sodio y dihidrógeno al 0,039% peso/volumen, a 4°C durante 24 horas, y luego se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana Diaflo UM 10 Amicon M.V.

15.3.71

388539



Mechelaarstraat 3 Oosterhout (NB.), Holanda, que no permite el paso de las moléculas con peso molecular mayor de 10.000. El contenido sólido del extracto, con exclusión de sales como se ha definido anteriormente en esta memoria, consistía en 80% en peso referido al peso seco del extracto de proteína, con pequeñas cantidades de lípidos, hidratos de carbono, y ácidos nucleicos. El espectro de absorción ultravioleta del extracto mostraba una banda de absorción amplia alrededor de 240-320 m μ , con una banda de absorción más intensa alrededor de 210 m μ . La relación de la densidad óptica a 280 m μ a la densidad óptica a 260 m μ fue 0,85. En la ultracentrífuga, el extracto acusó una mezcla compleja, teniendo la mayor parte del material pesos moleculares comprendidos entre 50.000 y 150.000.

Ejemplo 5: Preparación de un extracto inmunogénico soluble de linfocitos cultivados, producidos originalmente a partir de sangre humana, por lisis hipotónica.

Se recogieron linfocitos a partir de sangre humana y se purificaron como en el Ejemplo 1. Se estabilizaron cultivos de estas células después de estimulación con fitohemaglutinina, utilizando procedimientos bien conocidos (Ref. 14). Los cultivos establecidos se mantuvieron en un medio que contenía suero de ternera fetal al 10% peso/volumen, y se cogieron cuando fue preciso. Las células se lavaron repetidas veces en una solución acuosa de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen antes de someterlas a la lisis.

Se sometieron los linfocitos a la lisis como



se ha descrito en el Ejemplo 1 y el extracto soluble se recogió, se dializó, y se ultrafiltró como se ha descrito en el Ejemplo 4.

5 La muestra tenía un contenido de proteínas de 75% en peso referido al peso seco con exclusión de sales, como se ha definido anteriormente en esta memoria. El espectro ultravioleta mostraba un máximo de absorción cerca de 280 μ , típico de las proteínas, e indicativo de que el contenido de nucleótidos era bajo. En la ultracentrífuga análítica se observó una distribución de pesos moleculares, teniendo la mayor parte del material un peso molecular de alrededor de 60.000 (Ref. 1). La electroforesis sobre gel de poliacrilamida (Ref. 2) indicó que el extracto era una mezcla de varias proteínas y era esencialmente
10 similar al extracto descrito en el Ejemplo 2.
15

Ejemplo 6: Preparación de sueros de linfocitos de sangre anti-humana inmunosupresores no-tóxicos utilizando extracto preparado hipotónicamente.

20 Un extracto soluble de linfocitos de sangre humana preparado como se ha descrito en el Ejemplo 4, se inyectó en 3 conejos como se describe en el Ejemplo 3. Se recogió la sangre 46 días después del comienzo del procedimiento de inmunización, se coaguló, y los sueros así obtenidos se inactivaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.
25 Los sueros no ocasionaron hemorragias internas cuando se inyectaron (1 ml intraperitonealmente) en ratones, ni redujeron el contenido de plaquetas en la sangre de los ratones. Los sueros no aglutinaron las plaquetas humanas. Los
30

388539 18



sueros arrojaron en los ensayos de aglutinación de linfocitos, citotoxicidad, inhibición de rosetas, y hemaglutinación, los resultados que se indican en la Tabla 2. Los ensayos se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3, utilizando células humanas, excepto que los resultados representan diluciones de los sueros totales, no fraccionados.

TABLA 2

10

Conejo	Aglutinación de Linfocitos	Hemaglutinación	citotoxicidad	Inhibición de rosetas
1	1/32	1/192	1/48	1/32000
2	1/32	1/24	> 1/2	1/16000
3	1/96	1/12	> 1/2	1/8000

15

Los sueros se ensayaron también por inmunofluorescencia, para determinar la dilución máxima a la que podían detectarse anticuerpos de los sueros unidos a linfocitos humanos, detectándose los anticuerpos utilizando γ -globulina de cabra-anti-conejo marcada con fluoresceína. Los sueros 1, 2 y 3 arrojaron, respectivamente, resultados de 1/32, 1/256 y 1/256 en este ensayo.

25

Ejemplo 7: Preparación de sueros de linfocitos de sangre anti-humanos inmunosupresores no-tóxicos utilizando extracto preparado con tiocianato.

30

Una suspensión de células, que contenía -

15.3.71

388539

18



5 x 10⁹ linfocitos de sangre humana obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 1, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos para sedimentar las células. Se desechó el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en una solución acuosa 2 M de tiocinato potásico a 4°C. Se sometieron las células inmediatamente a la lisis, dando una suspensión muy viscosa. Se diluyó la suspensión con un volumen igual de una solución acuosa de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen mientras que se agitaba vigorosamente en un homogenizador Silverson (Silverson Machines Ltd., Londres). La suspensión se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se hizo pasar a través de una membrana Millipore GS con un tamaño de poro de 0,22 micras, llevándose a cabo la totalidad del procedimiento a 4°C. El tiocinato se separó por diálisis extensiva contra una solución acuosa de cloruro sódico al 0,85% peso/volumen. El extracto se inyectó en dos conejos como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se recogió la sangre 46 días después del comienzo del procedimiento de inmunización, se coaguló, y los sueros así obtenidos se inactivaron como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los sueros presentaron propiedades similares a los sueros descritos en el Ejemplo 6, excepto que los mismos no aglutinaban los eritrocitos humanos, y los valores encontrados en todos los ensayos inmunológicos contra linfocitos eran algo más bajos. Los valores obtenidos en los diversos ensayos se indican en la Tabla 3.

3885391



TABLA 3

Conejo	Aglutinación de linfocitos	Hemaglutinación	Citotoxicidad	Inhibición de rosetas
1	1/32	> 1/6	> 1/2	> 1/4000
5 2	1/8	> 1/6	> 1/2	> 1/4000

Se ensayaron también los sueros por inmunofluorescencia como se ha descrito en el Ejemplo 6, y arrojaron valores de 1/128 y 1/32, respectivamente.

10

Ejemplo 8: Preparación farmacéutica que contiene A.L.G..

A.L.G. producido conforme al procedimiento del Ejemplo 3 a una concentración de 7% peso/volumen con cloruro sódico al 0,85% peso/volumen en solución acuosa y que contenía, además, mertiolato a una concentración de 1/10.000 peso/volumen, esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore GS (tamaño de poro 0,22 micras) y se introdujo asépticamente en ampollas cada una de las cuales contenía 100 mg de proteína A.L.G. (determinado por el ensayo de Biuret), (Ref. 16). Se ensayaron muestras del material de llenado de las ampollas en cuanto a esterilidad, pirogenicidad, toxicidad, anormal en animales de laboratorio, y cierto número de ensayos clásicos para potencia y reacción no específicas. Este material era adecuado para administración intravenosa a una dosis de 20 mg por kg de peso corpóreo del paciente.

15

20

388539



18

Referencias (Ref.)

- Ref. 1: Halsall; Nature; 215: 880, 1967
- Ref. 2: B.J. Davis; 1964 Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404
- Ref. 3: E. Layne "Métodos en Enzimología" (Methods in Enzymology) Vol. III: p. 454, Ed. Colowick Y Kaplan, Academic Press.
- Ref. 4: O.H. Lowry y otros; 1951, J. Biol. Chem. 193: 265
- Ref. 5: Folch, Lees Y Sloane Stanley; Fed. Proc., 13: 209, 1954.
- Ref. 6: Dreywood; Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.); 18: 499, 1946
- Ref. 7: E.M. Lance y otros; 1968, Immunology 15: 571
- Ref. 8: "Manual de Inmunología Experimental" (Handbook of Experimental Immunology) Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, 1967
- Ref. 9: A.E.R. Thomson y otros; 1966 Brit. J. Haematol. 12: 433.
- Ref.10:)
P. ej. K. James y otros; 1969 Immunochemistry
- Ref.11:)
6:659
- Ref.12: H.M. Abaza y otros; 1966 Rev. Franc. Etud. Chem. Biol. 11: 821
- Ref.13: J.F. Bach y otros; 1969 Transplantation 8:265
- Ref.14: "Cultivos Celulares y de Tejidos" (Cell Y Tissue Culture) por J. Paul, 3ª edición, E. Y S. Livingstone, Edinburgh Y London, 1965.
- Ref.15: Steinbuch y Audran; 1969 Arch. Biochem, Biophys. 134: 279
- Ref.16: Leggett-Bailey; 1967 "Técnicas en Química de Proteínas" (Techniques in Protein Chemistry) Elsevier.
- Ref.17: Nerlin R.S.; 1970 "Bioquímica de los anticuerpos" Plenum Press. pp 28-29

15.3.71

388539



Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 27 de Febrero de 1.970 bajo el nº 9647/70 (prov.) y 13 de Enero de 1971 Nº 1677/71 se acoge a los beneficios del art. 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Un método de preparación de un suero antilinfocítico inmunosupresivo no-tóxico, caracterizado por el hecho de que se inyecta a un mamífero distinto del hombre una preparación estéril que comprende un extracto inmunogénico soluble de linfocitos de la sangre humana, siendo dicha preparación isotónica con la sangre del mamífero a utilizar; se extrae sangre del mamífero; se recupera el suero de la sangre; y se hace el suero estéril e isotónico con la sangre humana.

2.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se inyecta una preparación que comprende fundamentalmente una mez-

388539



5 cla de componentes macromoleculares cada uno de los cuales
tiene un peso molecular menor de 1.000.000 y mayor de -
10.000, teniendo la mezcla un contenido de proteínas com-
prendido entre 50 y 100%, un contenido de líquidos infe-
rior a 30% y preferiblemente inferior a 10%, expresándose
los porcentajes en peso referido a peso seco del extracto
con exclusión de sales, como se ha definido anteriormente
en esta memoria.

10 3.- Un método como el reivindicado en cual-
quiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por
el hecho de que se inyecta el extracto en el mamífero sub-
cutáneamente.

15 4.- Un método como el reivindicado en cual-
quiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el
hecho de que se inyecta el extracto en el mamífero por vía
intravenosa y/o intramuscular.

20 5.- Un método como el reivindicado en cual-
quiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por
el hecho de que la preparación comprende una emulsión de
agua en aceite, formando dicho extracto la base dispersa.

6.- Un método como el reivindicado en cual-
quiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el
hecho de que se inyecta el extracto en un mamífero de los
Ordenes Perisodáctilos o artiodáctilos.

25 7.- Un método como el reivindicado en la
reivindicación 6, caracterizado por el hecho de que se
inyecta el extracto en un caballo.

30 8.- Un método como el reivindicado en cual-
quiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por
el hecho de que se desactiva el suero sometiénolo a una

15.3.71

ME

388539

18



temperatura comprendida entre 50 y 65°C.

5 9.- Un método de preparación de un suero antilinfocítico inmunosupresivo no-tóxico como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por el hecho de que se prepara el extracto inmunogénico destruyendo por lisis los linfocitos de la sangre humana, aislando el extracto soluble del producto resultante de la lisis, y haciendo el extracto estéril e isotónico con la sangre del mamífero a utilizar.

10 10.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que los linfocitos de la sangre humana se obtienen a partir de sangre humana reciente.

15 11.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que los linfocitos se obtienen a partir de un cultivo de células de sangre humana.

20 12.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por el hecho de que los linfocitos se destruyen por lisis con ayuda de medios mecánicos en un tampón.

25 13.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por el hecho de que la lisis se lleva a cabo ultrasónicamente en un tampón.

30 14.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por el hecho de que la lisis se lleva a cabo con un agente que actúa fisicoquímicamente en conjunción con agitación mecánica.

38853918



15.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 14, caracterizado por el hecho de que el agente que actúa fisicoquímicamente comprende un tampón hipertónico en solución acuosa.

5 16.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 14, caracterizado por el hecho de que el agente que actúa fisicoquímicamente comprende una solución acuosa de una sal de tiocianato.

10 17.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 14, caracterizado por el hecho de que el agente que actúa fisicoquímicamente comprende un tampón hipotónico en solución acuosa.

15 18.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, caracterizado por el hecho de que se aísla el extracto soluble del producto resultante de la lisis por centrifugación.

19.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 18, caracterizado por el hecho de que se centrifuga a 60.000- 150.000 g durante 20 a 50 minutos.

20 20.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, caracterizado por el hecho de que se incluye la etapa de filtración por membrana a continuación de la centrifugación.

25 21.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, caracterizado por el hecho de que se efectúa la esterilización del extracto por filtración a través de una membrana.

30 22.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21, caracterizado por el hecho de que los procedimientos para preparar el extrac-

15.3.71

mce

388539



to inmunogénico se llevan a cabo a aproximadamente 4°C.

23.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado por el hecho de que se fracciona el suero antilinfocítico para producir una inmunoglobulina G antilinfocítica estéril que es no-tóxica e inmunosupresiva en el hombre, e isotónica con la sangre humana.

24.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 23, caracterizado por el hecho de que se separan globulinas de albúminas por fraccionamiento con sal del suero, y se aísla la inmunoglobulina G.

25.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 24, caracterizado por el hecho de que se efectúa el fraccionamiento con sal de suero con sulfato amónico.

26.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, caracterizado por el hecho de que se aísla la inmunoglobulina G a partir de las globulinas mediante una técnica por cargas utilizando un cambiador de anión.

27.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 26, caracterizado por el hecho de que se utiliza un cambiador de anión con base de polisacárido.

28.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 27, caracterizado por el hecho de que se utiliza DEAE-celulosa.

29.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 27, caracterizado por el hecho de que se utiliza DEAE-Sephadex.

30.- Un método como el reivindicado en cual-

388539

30 JUN 1973



quiera de las reivindicaciones 23 a 25, caracteriza-
do por el hecho de que se aísla la inmunoglobulina G
a partir de las globulinas por inmunoabsorción.

5 31.- Un método de preparación de un suero
antilinfocítico inmunosupresivo no-tóxico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria
que antecede, y con los fines que se han especifica-
do.

10 Esta Memoria consta de treinta y tres hojas
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 JUN. 1973

P.A.

Alberto de Eizaburu
Per Eizaburu

ME

27.6.73
MCM