

162

26 MAR. 1974

CONCEDIDA

MEMORIA DESCRIPTIVA de una Patente de Invención a nombre de: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, de nacionalidad alemana, domiciliada en l Berlin

65, Müllerstrasse 170-172 y 4619 Bergkamen, Waldstrasse 14. (ALEMANIA); por:

PROHIBIDA CONSULTA Y LA EXPEDICION DE COPIAS Y CERTIFICACIONES "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN AGENTE PARA LA INDUCCION DE UNA INMUNIDAD PRECOZ, LARGAMENTE DURADERA Y ACRECENTADA"

RECCION TECNICA CLASIFICACION I. P. C. CLASE C08 CLASE F

-----00000000-----

El invento concierne a un procedimiento para la preparación de un agente para la inducción de una inmunidad precoz o temprana, largamente duradera y acrecentada.

Ya es sabido que oligonucleótidos y polinucleótidos naturales y sintéticos acrecientan la respuesta de inmunidad (Braun y otros en Nucleic Acids Immunology, O.J. Plescia y W. Braun, Springer Verlag Nueva York, página 347 (1968)).

También es sabido que polianiones carboxilados, ta-

POOR QUALITY

las como poli(ácido acrílico), en presencia de antígenos aumentan las células formadoras de anticuerpos en el bazo así como la concentración de anticuerpos en el suero (T. Diamantstein y otros, Z. Klin. Chem. y Klin. Biochem. 9, página 632 (1970)).

5 Sin embargo, la respuesta de inmunidad acrecentada producida por estas sustancias, no sólo es corta sino que también está limitada predominantemente a la respuesta primaria, es decir a una respuesta de inmunidad, que aparece después de una primera y única administración del antígeno. Además de  
10 ello, el aumento tanto de la respuesta de inmunidad primaria como también de la respuesta de inmunidad secundaria queda limitado a los anticuerpos de la clase 19 S.

Se ha encontrado ahora que la administración de polianiones sulfatados (ésteres de sulfato de polímeros) conduce a un aumento precoz de los anticuerpos circulantes y conduce a una concentración de anticuerpos acrecentada que se conserva durante varias semanas. A diferencia de los polianiones carboxilados y fosfatados, la administración de polianiones sulfatados no sólo conduce al aumento de la concentración de anticuerpos que pertenecen a la clase 19 S, sino también al  
20 aumento de la concentración de anticuerpos que pertenecen a la clase 7 S. Además de ello, se inicia la formación de anticuerpos tanto de la clase 19 S como también de la clase 7 S en un momento más temprano en comparación con las composiciones testigo.  
25

A diferencia de los polinucleótidos, los polianiones sulfatados aumentan también en un valor múltiplo la respuesta

secundaria. Este efecto de provocación de la respuesta secundaria se puede lograr tanto con una dosis de antígenos baja como también con una dosis de antígenos óptima.

5 La formación de anticuerpos (inmunización) por polianiones sulfatados se manifiesta del modo más intenso en el caso de administración de dosis bajas de antígenos en forma de inyección primaria y en forma de inyección secundaria. En un margen de dosis en el cual los antígenos solos no producen ni una respuesta primaria típica ni una respuesta secundaria típica, en el caso de administración simultánea de polianiones sulfatados se llega a una respuesta primaria típica y a una  
10 respuesta secundaria típica, las cuales respuestas en caso contrario sólo se pueden lograr con dosis de antígenos óptimas.

En el caso de administración de polianiones sulfatados con o sin antígeno se llega además a un aumento hasta de  
15 3 veces de la fracción de  $\gamma$ -globulina en el suero.

Objeto del invento son por consiguiente agentes para la inducción de una inmunidad precoz, largamente duradera y acrecentada, que consiste en dosis de antígeno inferiores a la óptima y ésteres de sulfato de polímeros, así como agentes para  
20 aumentar la defensa específica y la defensa no específica contra infecciones bacterianas y virales, a base de ésteres de sulfato de polímeros.

Además, el invento concierne a un procedimiento para  
25 la inducción de la formación de anticuerpos en un huésped o en un cultivo de tejidos, caracterizado porque se aplica un agente a base de dosis de antígenos inferiores a la óptima y

ésteres de sulfato de polímeros, así como a procedimientos para el aumento de la defensa específica y de la defensa no específica contra infecciones bacterianas y virales, caracterizado porque se aplica un agente a base de ésteres de sulfato de polímeros.

5

Como antígenos se deben entender todas las sustancias que pueden inducir una formación de anticuerpos en un huésped.

En calidad de ésteres de sulfato de polímeros entran en consideración por ejemplo:

10

Dextransulfato  $\left[ \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3 (\text{OSO}_3\text{Na})_{1-2} \right]_n$  con un peso molecular medio de 500.000 ( $\text{DS}_{500}$ )

Dextransulfato  $\left[ \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3 (\text{OSO}_3\text{Na})_{1-2} \right]_n$  con un peso molecular medio de 50.000 ( $\text{DS}_{50}$ )

15

Polivinilsulfato  $\left[ \text{C}_2\text{H}_3(\text{OSO}_3\text{Na}) \right]_n$  (Serva, Heidelberg),

Pentosansulfato con un peso molecular de 2.000 ( $\text{SP}_{54}$ ),

además levansulfato, heparina, ácido condroitinsulfúrico, ácido hialurónico, etc.

20

La cantidad eficaz de éster de sulfato es diferente para cada sustancia en particular. En general son necesarias dosis de 0,05-200 mg por kg de peso corporal.

25

Los antígenos y ésteres de sulfato del polímero pueden ser añadidos de modo simultáneo o en diferentes momentos. Así, todavía se observan claros efectos cuando el éster de sulfato es administrado hasta 24 horas antes o hasta 24 horas después de la introducción de antígeno. Sin embargo, los mejores

resultados se obtienen cuando el antígeno y los ésteres de sulfato son aplicados de modo simultáneo o de modo sucesivo con un pequeño intervalo entre las aplicaciones. En el caso de la utilización de eritrocitos de carnero en calidad de antígenos, se aconseja aplicar los ésteres de sulfato aproximadamente 10 minutos antes o después de la administración de antígenos.

La administración en el caso de un animal de sangre caliente como huésped se puede efectuar por ejemplo por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o per-oral. Las sustancias son administradas de modo general en solución fisiológica tamponada de sal común.

Los agentes de acuerdo con el invento son sobresalientemente apropiados como vacunas para la inducción de una inmunidad precoz, largamente duradera y acrecentada.

Las vacunas poseen la ventaja de que la dosis de antígeno ha sido disminuída en relación con vacunas conocidas comparables. De esta modo se evitan las complicaciones o efectos secundarios provocados por elevadas dosis de antígeno.

Además, se aumentan fuertemente la defensa específica y la defensa no específica contra infecciones bacterianas y virales. Los ésteres de sulfato pueden ser administrados tanto profilácticamente en el caso de peligro de infección acrecentada como también en el caso de una infección que ya se ha producido, con el fin de influir entonces favorablemente sobre el transcurso de la enfermedad. Entonces ya no es necesaria ninguna adición de antígeno. Además, los polianiones sulfatados poseen una actividad antitumoral.

A partir de la sangre de animales, que habian sido tratados con el agente de acuerdo con el invento se pueden obtener antisueros. Los antisueros se necesitan para determinaciones inmunológicas, por ejemplo de hormonas.

5 El invento concierne por consiguiente también a un procedimiento para la obtención de antisueros con elevada concentración, que esté caracterizado porque el agente de acuerdo con el invento es aplicado, después de 5 hasta 120 días se retira sangre y se prepara el suero de manera usual.

10 Los siguientes ejemplos deben explicar el invento con más detalle.

#### EJEMPLO 1

##### Soluciones para la administración intraperitoneal o intravenosa.

- 15 a) 100 mg de dextransulfato DS<sub>500</sub> (Serva, Heidelberg) son disueltos en 50 ml de solución de sal común fisiológica 0,15 molar estéril tamponada con sulfato a pH = 7,2 (PBS) y son cargados en ampollas de 0,5 ml cada una.
- b) 2 x 10<sup>6</sup> eritrocitos de carnero (Behringwerke, Marburg) son lavados tres veces con PBS y luego son suspendidos en 0,5 ml  
20 de PBS.

#### EJEMPLO 2

##### Soluciones para la administración subcutánea.

- 25 a) 100 mg de dextransulfato DS<sub>50</sub> (Serva, Heidelberg) son disueltos en 50 ml de solución de sal común fisiológica 0,15 molar estéril tamponada con fosfato a pH = 7,2 (PBS) y son cargados

en ampollas de 0,5 ml cada una.

b)  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (Behringwerke, Marburg) son lavados tres veces con PBS y luego son suspendidos en 0,5 ml de PBS.

5

### EJEMPLO 3

20 ratones blancos de la raza NMRI recibieron intraperitonealmente (i. p.) 1 mg de dextransulfato DS<sub>500</sub> (Serva, Heidelberg) en 0,5 ml de solución de sal común fisiológica estéril 0,15 molar tamponada con fosfato a pH 7,2 (PBS).

10

Después de 10 minutos, los animales fueron inmunizados i.p. con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (Behringwerke, Marburg). Los eritrocitos de carnero fueron lavados previamente tres veces con PBS y luego fueron suspendidos en 0,5 ml de PBS.

15

Otros 20 ratones fueron inmunizados i.p. sólo con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero en 0,5 ml de PBS.

96 horas después del comienzo del ensayo se obtuvieron sueros por punción del corazón. A continuación los animales fueron muertos por decapitación y se prepararon de manera usual, en frío, suspensiones de células esplénicas (del bazo).

20

### En el suero

La concentración de hemolisina anti-eritrocitos de carnero se determinó de acuerdo con Sabet y otros (Immunology 1969, 16:433). Como concentración se indica la máxima dilución de suero que produce una hemólisis completa de los eritrocitos añadidos.

25

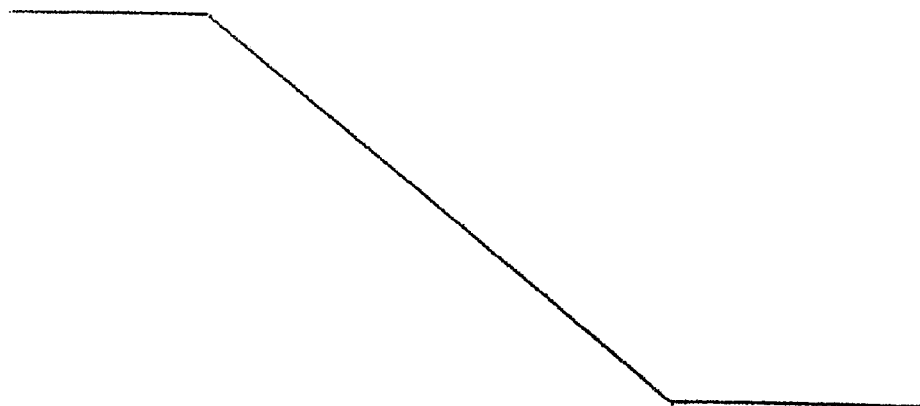
En los animales tratados con eritrocitos de carnero y DS<sub>500</sub> se determinó una concentración de anticuerpos de 256, y en los animales testigo tratados sólo con eritrocitos de carnero se determinó una concentración de anticuerpos menor de 8.

5 En el bazo

El número de las células esplénicas dirigidas contra los eritrocitos de carnero formadoras de anticuerpos 19 S y 7 S fue determinada con el método de acuerdo con Jerne y otros (Conference on Cell Bound Antibodies, Editores: B. Amos y H. Koprowski, página 109, Wistar Institute Press, Philadelphia (1963)).

15 En los animales tratados con eritrocitos de carnero y DS<sub>500</sub> se determinaron  $65.000 \pm 10.000$  células formadoras de anticuerpos por cada bazo, y en los animales testigo tratados sólo con eritrocitos de carnero se determinaron 41 células formadoras de anticuerpos por cada bazo.

De manera análoga se inmunizaron ratones con eritrocitos de carnero y 1 mg de DS<sub>50</sub>, PVS o SP<sub>54</sub>. Los resultados están recopilados en la Tabla I.



T A B L A I

Estimulación de la formación de anticuerpos por polianiones sulfatados (ésteres de sulfato de polímeros)

5	Polianiones sulfatados	Grupo $SO_4$ Atomos de carbono	Números de las CFAC/ $10^6$ células esplénicas	Número de las CFAC/bazo	Concentración de anticuerpos.
	DS <sub>500</sub>	1/3	244±50	65 000 ± 10 000	256
	DS <sub>50</sub>	1/3	210±60	58 000 ± 8 600	128
10	PVS	1/2	25,0±6	6 500 ± 1 000	32
	SP <sub>54</sub>	1/3	71±12	15 000 ± 3 000	64
	Testigos	-	0,4	41	<8

CFAC = Células formadoras de anticuerpos

15 Concentración de anticuerpos  $\hat{=}$  concentración de anticuerpos que hemolizan eritrocitos de carnero.

EJEMPLD 4

20 En un ensayo análogo al Ejemplo 3 se investigó la dependencia con la dosis de SP<sub>54</sub> (inmunización con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero después de diferentes administraciones de SP<sub>54</sub>). Los resultados se desprenden de la representación gráfica en la figura 1. Con 4 mg de SP<sub>54</sub> se determinan concentraciones y valores de CFP óptimos. (CFP = células formadoras de placas  $\hat{=}$  células formadoras de anticuerpos).

EJEMPLO 5

En un ensayo análogo al Ejemplo 3 se investigó la dependencia con la dosis de DS<sub>500</sub> (inmunización con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero después de diferentes administraciones de DS<sub>500</sub>). Los resultados se desprenden de la representación gráfica en la figura 2.

EJEMPLO 6

En un ensayo análogo al Ejemplo 3 se investigó la respuesta primaria después de inmunización con 1 mg de DS<sub>500</sub> y diferentes dosis de antígeno [ $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  y  $2 \times 10^8$  eritrocitos de carnero (EC)]. Los resultados se desprenden de la representación gráfica (en la figura 1). Con  $2 \times 10^6$  hasta  $2 \times 10^7$  eritrocitos se manifiesta el máximo efecto.

EJEMPLO 7

En un ensayo análogo al Ejemplo 3 se determinó la respuesta secundaria (segunda inmunización efectuada 30 días después de la primera inmunización) después de administración de 1 mg de DS<sub>500</sub> y de diferentes dosis de antígenos. Los resultados se desprenden de las representaciones gráficas (figuras 4-6).

En la figura 4 se representa la concentración de anticuerpos hemolizadores de eritrocitos de carnero en el suero de los animales de ensayo (después de tratamiento con eritrocitos de carnero y DS<sub>500</sub>) y en los animales testigo (después de tratamiento con eritrocitos de carnero).

La figura 5 muestra la respuesta secundaria en ratones tratados con  $DS_{500}$ , que recibieron en la primera y en la segunda inyecciones  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero.

5 La figura 6 muestra la respuesta secundaria en ratones tratados con  $DS_{500}$ , que recibieron como primera inyección una dosis de antígeno inferior a la óptima ( $2 \times 10^6$  EC) y como segunda inyección una dosis de antígeno óptima ( $2 \times 10^8$  EC).

#### EJEMPLO 8

10 Se evaluó de modo separado y cuantitativo el suero de ratones no inmunizados y de ratones no inmunizados pero tratados con 1 mg de  $DS_{500}$  i. p., por electroforesis sobre tiras de acetato de celulosa de acuerdo con el método de Kohn (Shandon Instrument Applications : Zur Technik der Zelluloseacetat-Elektrophorese 1965, número 11 (6)). Tal como lo muestra la  
15 figura 7, la  $DS_{500}$  aumenta al doble la fracción de  $\gamma$ -globulina.

#### EJEMPLO 9

20 Como ejemplo del efecto de un éster de sulfato polímero sobre la formación de anticuerpos para otro antígeno (albúmina de suero de vacuno = ASV) y con aplicación subcutánea se ha comparado el efecto de  $DS_{500}$  con el efecto de adjuvante completo de FREUND (ACF).

25 Conejos de un peso de 2-2,5 kg han sido inyectados subcutáneamente en la región cervical con 10 mg/kg de ASV (Behring-Werke, Marburg) subcutáneamente. Otro grupo de conejos fue inyectado del mismo modo, pero con una mezcla de 10 mg/kg

de ASV con 1 ml de ACF/kg. Un tercer grupo de conejos recibió 10 mg/kg de ASV mezclados con 33 mg/kg de DS<sub>500</sub> administrados del modo arriba descrito. El ASV y el DS<sub>500</sub> fueron disueltos en cada caso en 1 ml de solución fisiológica de sal común tamponada con fosfato (PBS) a pH = 7,2. Como testigos adicionales sirvieron animales que recibieron 2 ml de PBS. Las concentraciones de anticuerpos en el suero de los animales han sido determinadas radioinmunológicamente después de diferentes espacios de tiempo ayudándose de CATT, del siguiente modo:

suero diluido a 1:1000 con tampón de bicarbonato (pH= 9,6; 0,5 molar) fue absorbido en tubitos de poliestireno y se midió la fijación específica de ASV marcado con I<sup>131</sup> en los tubitos de poliestireno recubiertos con antisuero. La radioactividad fijada ha sido medida con un contador de radiaciones (PACKARD) y se designa en lo que sigue como concentración de anticuerpos. La tabla 2 muestra los resultados de tal ensayo. Mientras que los sueros de los animales que habían sido inyectados sólo con ASV no tuvieron ningún aumento conmensurable de la concentración de anticuerpos en comparación con animales no inmunizados, los animales que habían sido inyectados con una mezcla de ASV y ACF, tenían el día 15 después de la inmunización una concentración de 200 y en el día 30 una concentración de 370. Los animales tratados con una mezcla de ASV y DS<sub>500</sub> mostraron en el día 15 una concentración de 380 y en el día 30 una concentración de 430.

T A B L A 2: Concentración de anticuerpos

Día de la deter- minación de con- centración después de tratamiento.	Tratados con PBS (2 ml)	10 mg de ASV/kg en 2 ml de PBS	10 mg de ASV/kg en 1 ml de PBS + 1 ml de ACF/kg	10 mg de ASV/kg + 33 mg/kg de D5500 en 2 ml de PBS.
---	----------------------------	--------------------------------------	---	--

15.

0

0

200

380

30.

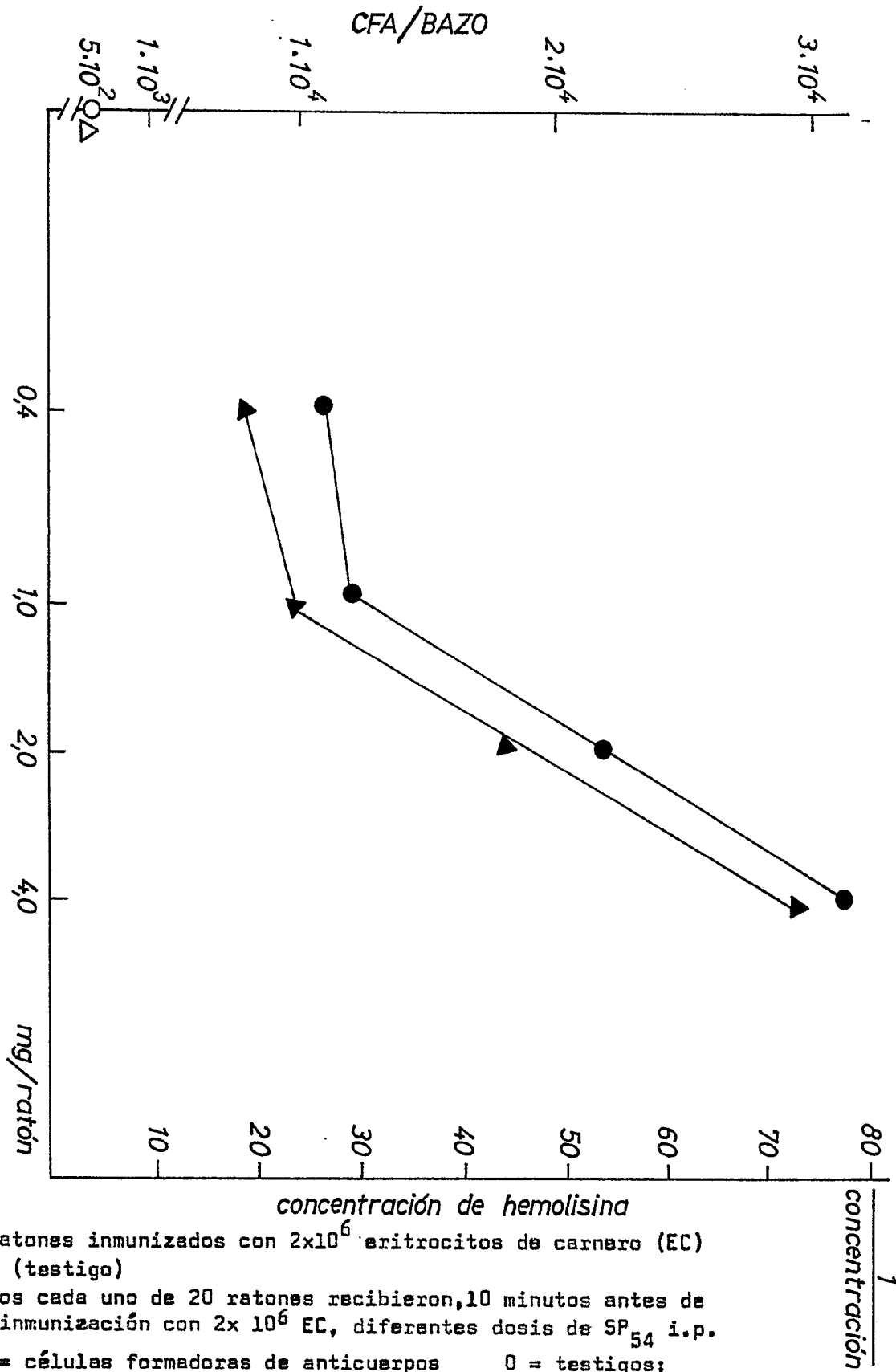
0

0

370

430

Figura 1 (Ejemplo 4) Dependencia con la dosis del efecto de SP<sub>54</sub>



20 ratones inmunizados con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (EC) i.p. (testigo)

Grupos cada uno de 20 ratones recibieron, 10 minutos antes de la inmunización con  $2 \times 10^6$  EC, diferentes dosis de SP<sub>54</sub> i.p.

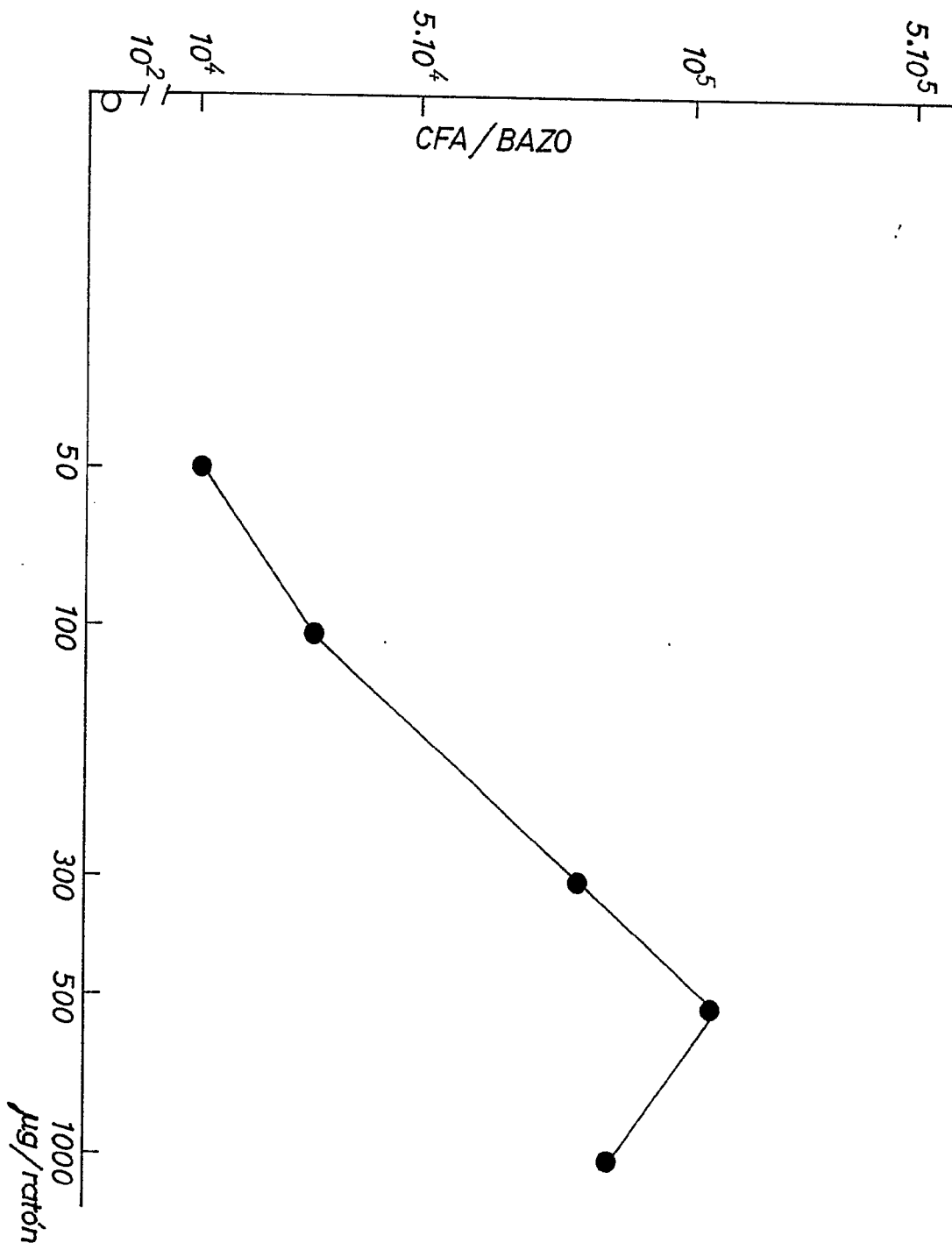
CFA = células formadoras de anticuerpos      0 = testigos;

● = tratados con SP<sub>54</sub>.

Concentración de anticuerpos (valor recíproco): Δ = testigos;

▲ = tratados con SP<sub>54</sub>.

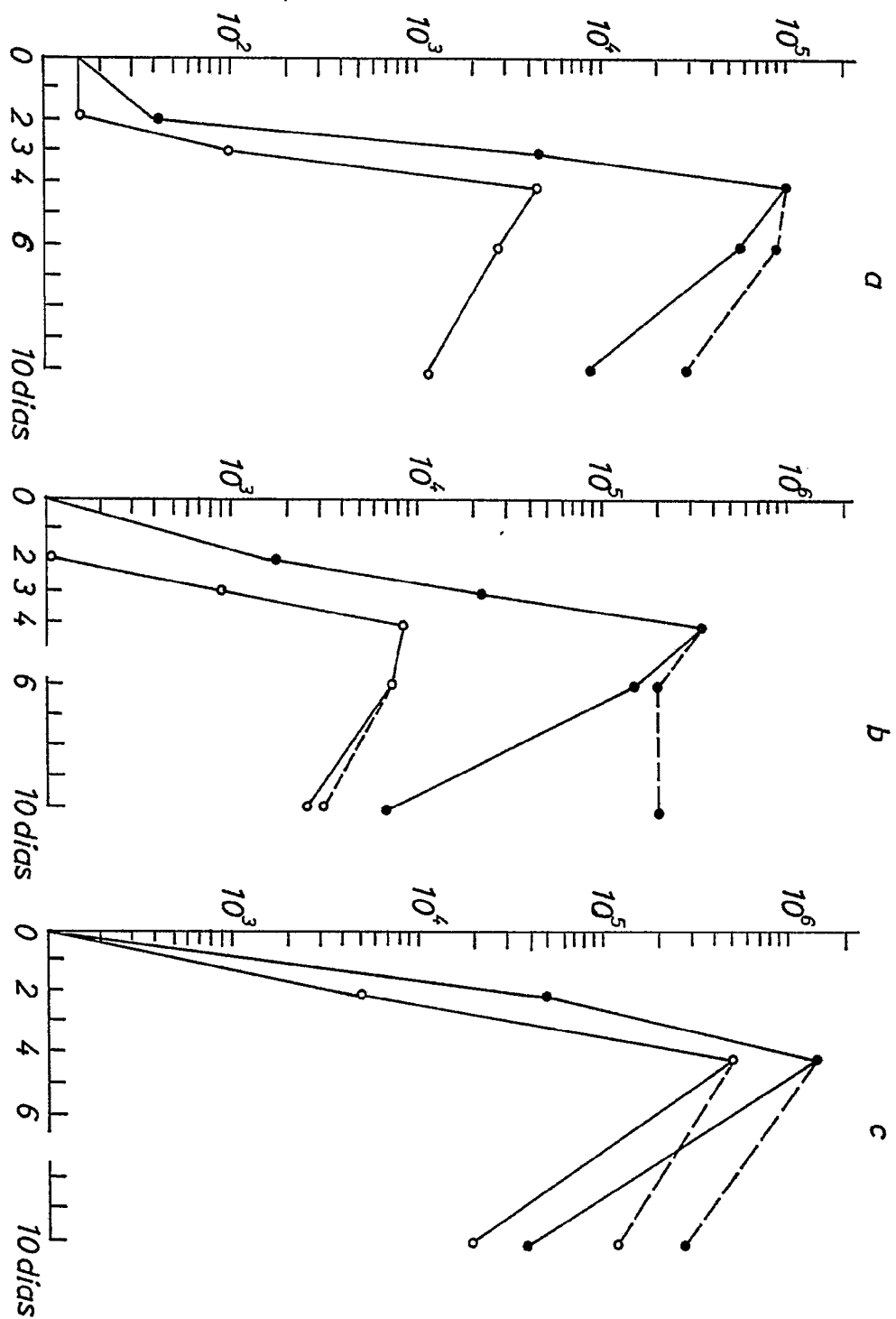
Figura 2 (Ejemplo 4) Dependencia con la dosis del efecto de  $DS_{500}$



20 ratones inmunizados con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (EC) i.p. (testigos). Grupos cada uno de 20 ratones recibieron, 10 minutos después de la inmunización con  $2 \times 10^6$  EC, diferentes dosis de  $DS_{500}$  i.p.

C.F.A = células formadoras de anticuerpos; 0 = testigos

● = tratados con  $DS_{500}$ .



a) dosis de antígeno  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (EC)  
 b) dosis de antígeno  $2 \times 10^7$  EC; c) dosis de antígeno  $2 \times 10^8$  EC  
 O = inmunizados; ● = inmunizados y tratados con 1 mg de DS<sub>500</sub>  
 Línea continua = células formadoras de anticuerpos 19 S;  
 línea de rayas = células formadoras de anticuerpos 19 S y 7 S.  
 CEA = células formadoras de anticuerpos.

Figura 4 (con relación al Ejemplo 7)

Animales testigos fueron inmunizados por primera vez con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (EC) y 30 días más tarde de nuevo con  $2 \times 10^6$  EC i.p. Otro grupo de ratones, inmunizados del mismo modo, recibieron 15 minutos después de la primera y de la segunda inmunizaciones 1 mg de DS<sub>500</sub> i.p.

Testigo = O; tratado con DS<sub>500</sub> = ●; líneas continuas = concentración de anticuerpos 19 S y 7 S; línea de rayas = concentración de anticuerpos 7 S.

Coordenadas:

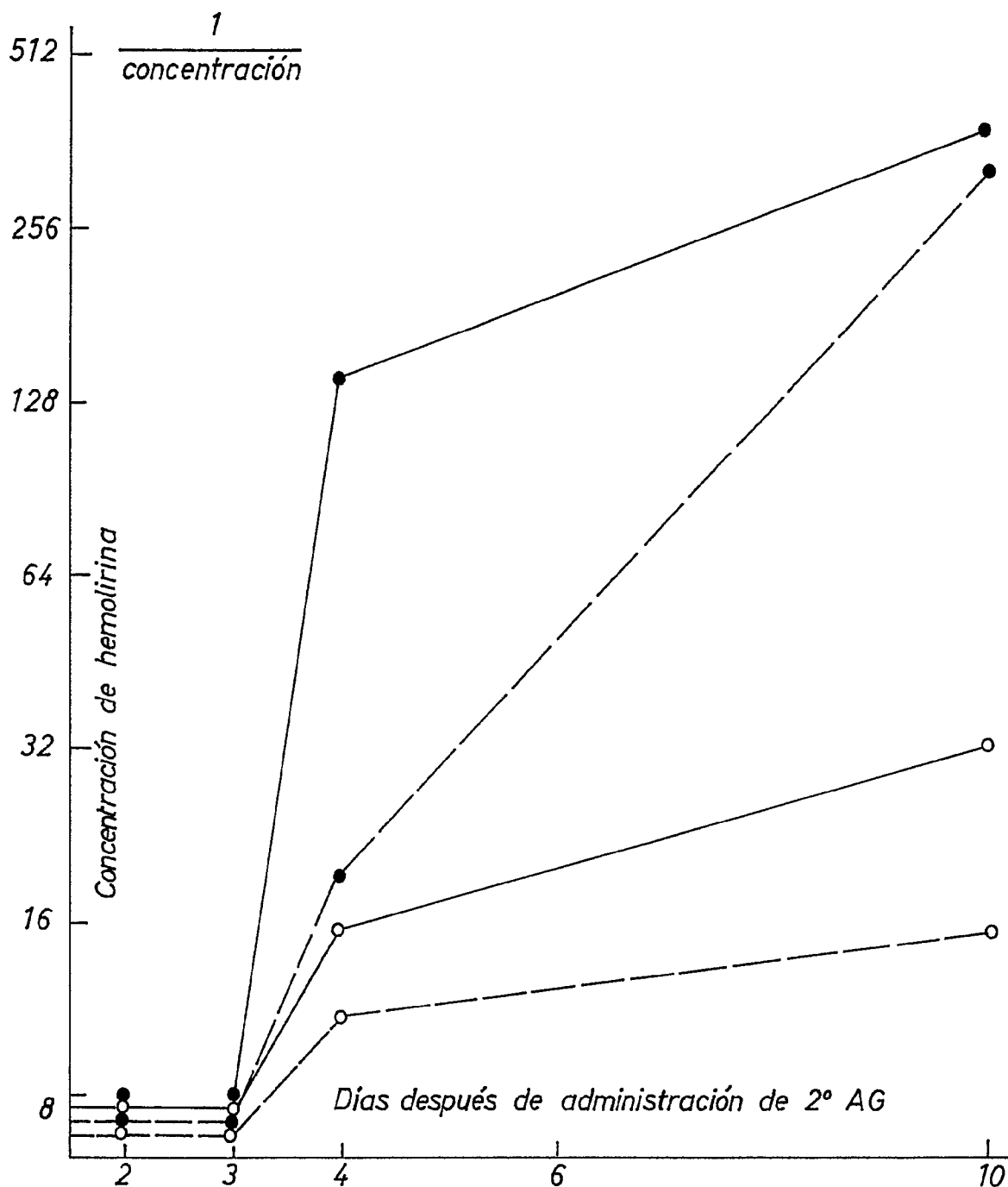
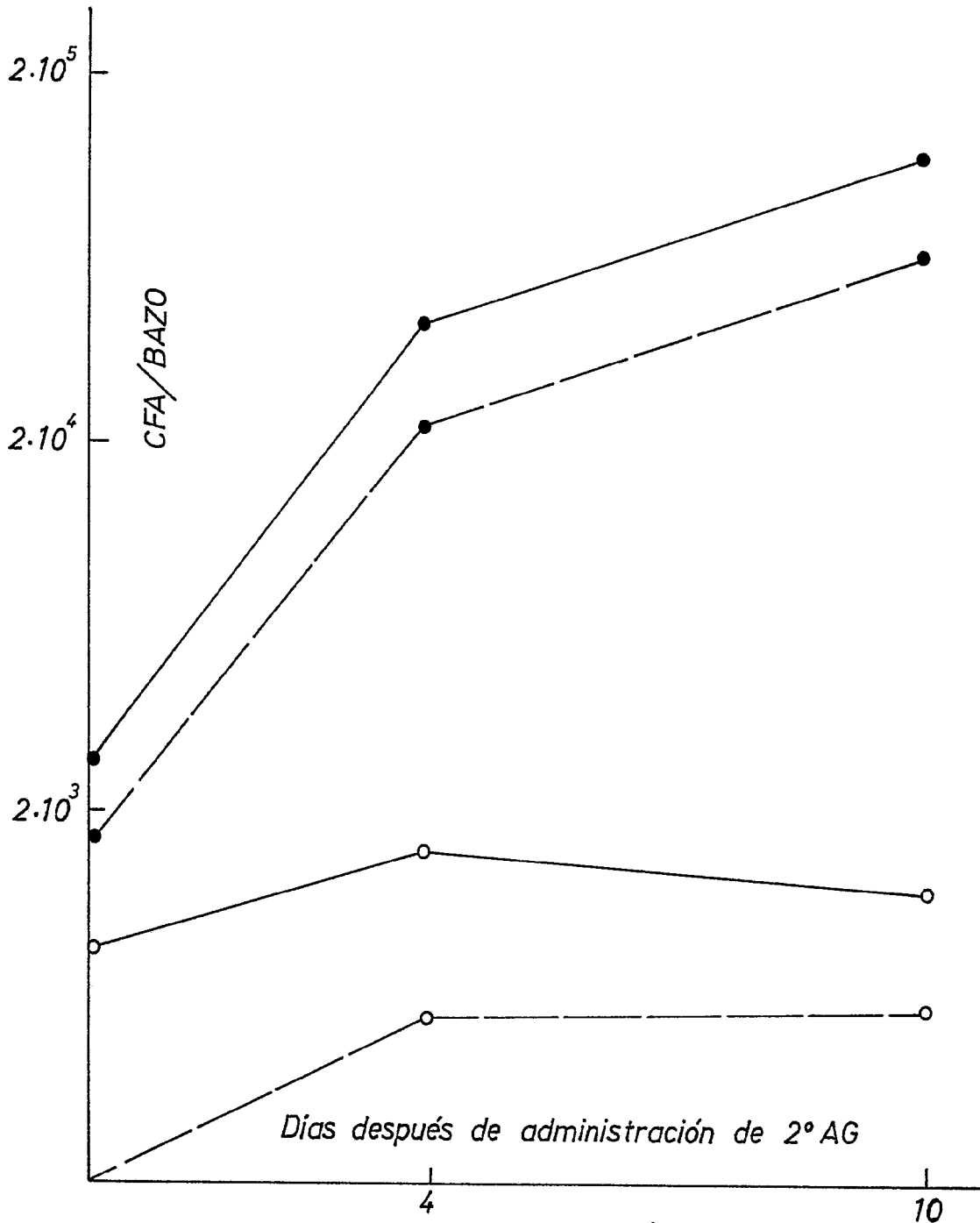


Figura 5 (con relación al Ejemplo 7)



Ratones son inmunizados por primera vez con  $2 \times 10^6$  eritrocitos de carnero (EC) y 30 días más tarde de nuevo con  $2 \times 10^6$  EC i.p. Otros ratones inmunizados de la misma manera recibieron 15 minutos después de la primera y de la segunda inmunizaciones 1 mg de  $DS_{500}$  i.p.

○ = testigos; ● = tratados con  $DS_{500}$ ; línea continua = células formadoras de anticuerpos 7 S + 19 S; líneas de rayas = células formadoras de anticuerpos 7 S. CFA = células formadoras de anticuerpos.

Figura 6 (con relación al Ejemplo 7)

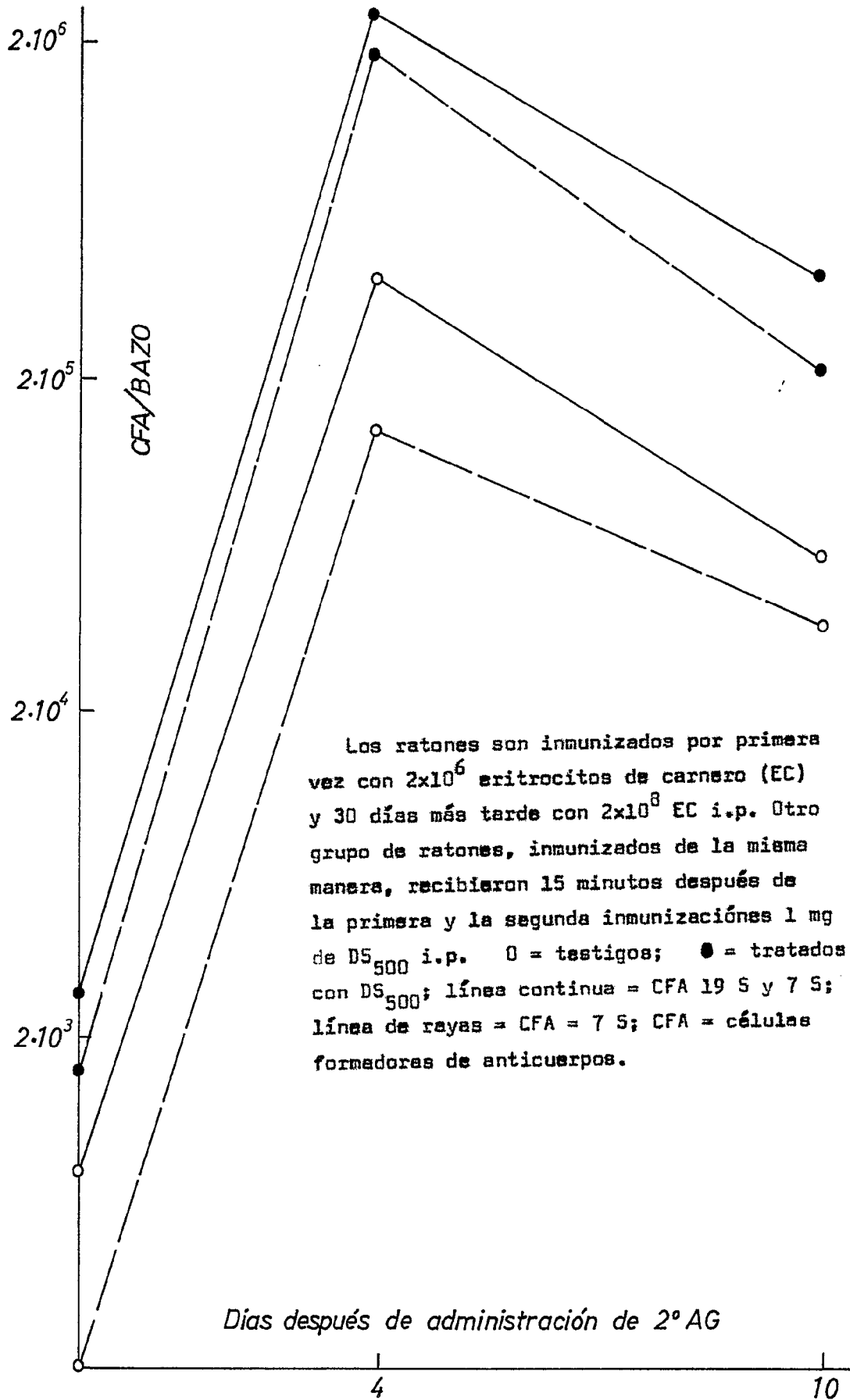
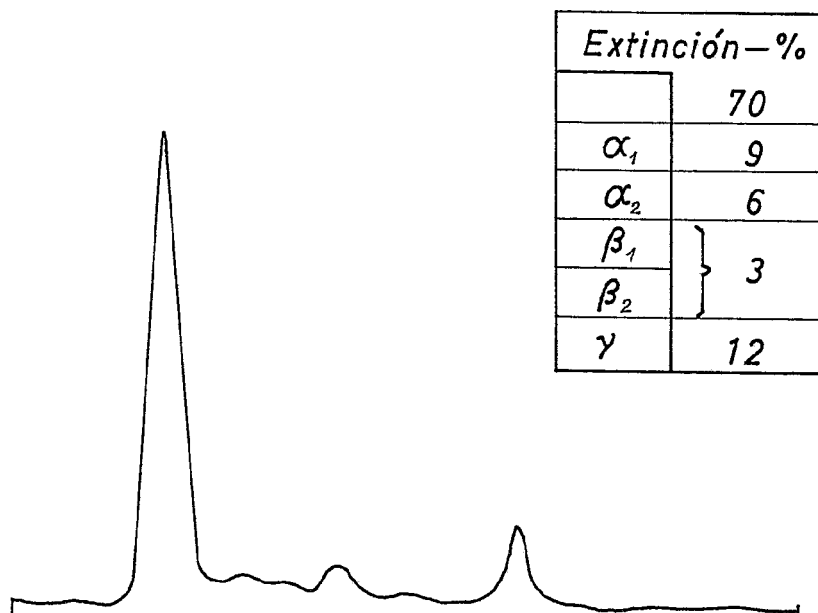
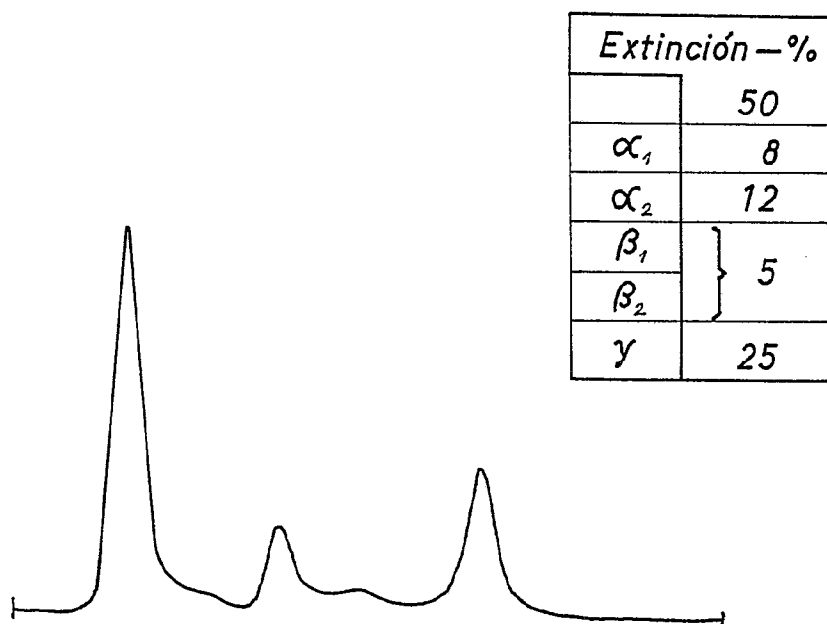


Figura 7 (Ejemplo 8)

antes de tratamiento con DS<sub>500</sub>



4 días después de tratamiento con 1 mg de DS<sub>500</sub>



-----N O T A-----

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

5 1.- Procedimiento para la preparación de un agente para la inducción de una inmunidad precoz, largamente duradera y acrecentada, caracterizado porque se disuelven de modo separado ésteres de sulfato de polímeros y antígenos en solución fisiológica de sal común tamponada y se carga en ampollas.

10 2.- Procedimiento según reivindicación anterior, caracterizado porque dicho agente consiste en dosis de antígenos inferiores a la óptima y ésteres de sulfato de polímeros.

15 3.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho agente consiste en dosis de antígeno inferiores a la óptima y dextransulfato, polivinilsulfato, pentosansulfato, levansulfato, heparina, ácido condroitinsulfúrico o ácido hialurónico en calidad de ésteres de sulfato de polímeros.

20 4.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho agente posee un contenido de 0,05 hasta 200 mg de ésteres de sulfato de polímeros por kg de peso corporal.

25 5.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la preparación de un agente para aumentar la defensa específica y no específica contra infecciones bacterianas y virales, se establece que se disuelvan ésteres de sulfato de polímeros en solución fisiológica de sal común

tamponada y se carga en ampollas.

6.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el contenido del agente de 0,5 hasta 200 mg de ésteres de sulfato de polímeros por kg de peso corporal.

5

7.-"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN AGENTE PARA LA INDUCCION DE UNA INMUNIDAD PRECOZ, LARGAMENTE DURADERA Y ACRECENTADA"

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola cara.

10

Madrid, 25 FEB. 1972

CARLOS FERNANDEZ CÁMDELA

