



72

Int. Cl.: <u>A61k</u>

P.- 53.647
Cutter - 29

412551

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

para solicitar P A T E N T E D E I N V E N C I O N por 20 años

A nombre de C U T T E R L A B O R A T O R I E S , I N C .

entidad n o r t e a m e r i c a n a

con domicilio en F o u r t h a n d P a r k e r S t r e e t s , B e r k e l e y ,
California, Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA SERO-
GLOBULINA"

(Clase Internacional A61k)



412551

5 Este invento se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una nueva seroglobulina inmune modificada susceptible de ser inyectada por vía intravenosa, a un procedimiento para la producción de las mismas, y a su utilización para administrar seroglobulina inmune por vía intravenosa para terapia humana.

10 Los preparados usuales de gamma-globulina no pueden ser administrados por vía intravenosa ya que dicha administración provoca un grado bastante elevado de aparición de reacciones, especialmente en seres receptores agamma-globulinémicos. Estas reacciones han estado asociadas con una disminución de niveles de complemento de suero, aparentemente causada por una fijación de complemento por la gamma-globulina administrada. Véase S. Barandun y otros, Vox Sang. 7, 157-174 (1962). La capacidad de la gamma-globulina para fijar complemento, denominada anticomplementaria, es aumentada grandemente como resultado de la desnaturalización producida durante el método de fraccionamiento, en particular por aglomeración a la forma de especies de alto peso molecular. El mecanismo de fijación de complemento de estos aglomerados parece ser idéntico al de los complejos de antígenos-anticuerpos. Véase D. M. Marcus, J. Immunol. 84, 273-284 (1960). Cuando los aglomerados son eliminados por ultracentrifugación a 100.000 veces la gravedad, se

412551

12



obtiene un producto de baja actividad anticomplemento que es bien tolerado al ser administrado por inyección intravenosa. Véase Barandun y otros, supra.

5 Se han efectuado diversos intentos para resolver el problema de hacer a la gamma-globulina segura para administración intravenosa. Todos estos dependen de la eliminación de su actividad anticomplemento. La ultracentrifugación (arriba citada) no es factible técnicamente, y se puede esperar que el producto derivado y obtenido de este modo recupere su actividad anticomplemento al ser almacenado. El tratamiento de la gamma-globulina con la enzima pepsina a pH 4,0 da como resultado un desdoblamiento proteolítico de la molécula para dar un fragmento con un peso molecular de aproximadamente 100.000 que tiene un coeficiente de sedimentación en la ultracentrífuga de aproximadamente 5S. Véase A. Nisonoff y otros, Science, 132, 1770-1771 (1960). Incluso aunque este fragmento superviviente retiene actividad anticuerpos bivalente y carece de actividad anticomplemento, y es bien tolerado y eficaz en administración por vía intravenosa, véase W. Baumgarten, Vox Sang. 13, 84 (1967), el efecto terapéutico proporcionado por él tiene una duración inaceptablemente corta ya que es excrecionado con rapidez, teniendo una semi-vida en circulación de sólo 18 horas, posiblemente algo más larga en pacientes agammaglobulinémicos,

10

15

20

25

412551

12



comparado con 19,8 días para la gamma-globulina no modificada. Véase E. Merler y otros, Vox Sang. 13, 102 (1967); B. Jager, Arch. Intern. Med. 119, 60 (1967). Aunque la semi-vida muy reducida de la gamma-globulina tratada con pepsina es debida probablemente en parte a la drástica reducción del tamaño de la molécula, hay indicaciones acerca de que la velocidad de catabolismo de la gamma-globulina está relacionada con propiedades específicas de la porción de la molécula digerida por pepsina. Véase J. L. Fahey y otros, J. Exper. Med., 118, 845-868 (1963). Esta porción de la molécula permanece intacta en el presente invento. Una desventaja adicional del método de tratamiento con pepsina consiste en que la pepsina que queda presente es de origen animal y puede estimular la producción de anticuerpos, particularmente por administración repetida. C. Blatrix y otros, Presse Med. 77, 635-637 (1969). La utilización de plasmina de origen humano evita esta dificultad y constituye la base de un procedimiento diferente para la preparación de gammaglobulina intravenosa.

El tratamiento de gamma-globulina con plasmina humana da como resultado el desdoblamiento en tres componentes con un peso molecular de aproximadamente 50.000. Véase J. T. Sgouris, Vox Sang. 13, 71 (1967). Cuando se utilizan niveles suficientemente bajos de plas



mina, sólo se desdoblán aproximadamente 15% de las molé-
culas, quedando 85% en forma de gamma-globulina intacta.
Véase Sgouris, supra. La gamma-globulina intacta que que-
da sin digerir manifiesta poca actividad anticomplemento
5 y ha sido administrada por vía intravenosa sin reaccio-
nes desfavorables. Véase J. Hinman y otros, Vox Sang. 13,
85 (1967). El material así preparado resulta retener "in
vitro" y "in vivo" actividad protectora. Véase F. K.
Fitzpatrick, Vox Sang. 13 85 (1967). Una desventaja de
10 este intento consiste en que la plasmina no puede ser
eliminada completamente. Por lo tanto, continúa la degra-
dación incluso aunque el material sea almacenado a 4°C.

La incubación de gamma-globulina a pH 4,0
a 37°C durante diversos espacios de tiempo se ha obser-
15 vado que reduce la actividad anticomplemento a bajos ni-
veles. Se ha sugerido que este resultado puede deberse
a una pequeña cantidad de enzima de suero presente como
una impureza en la gamma-globulina. Véase Blatrix y
otros, supra. Igual que con la gamma-globulina tratada
20 con plasmina, esta "gamma-globulina de pH 4,0" se ha
encontrado que recupera actividad anticomplemento al ser
almacenada con una velocidad impredecible, de modo que
es necesario analizar la actividad anticomplemento antes
de efectuar la administración a un paciente. Véase J.
25 Malgras y otros, Rev. Franc. Trans., 13, 173 (1970).

412551



Tanto la gamma-globulina tratada con plasmina, Hinman y otros, supra, y la gamma-globulina de pH 4,0, H. Koblet y otros, Vox Sang. 13, 93 (1967); J. V. Wells y otros, Austr. Ann. Med. 18, 271 (1969), tienen semi-vidas más cortas "in vivo" que la gamma-globulina no modificada. Por ejemplo, la semi-vida en pacientes normales de la gamma-globulina de pH 4,0 es aproximadamente de 14 días, véase Koblet y otros, supra, mientras que el material tratado con plasmina manifiesta una semi-vida de 16 días, véase Merler y otros, supra.

El Centre National de Transfusion Sanguine (C.N.T.S.) de Paris, mediante fraccionamiento y filtración realizados cuidadosamente de la gamma-globulina a partir de plasma seleccionado recientemente obtenido, ha producido una gamma-globulina inyectable por vía intravenosa con baja actividad anticomplemento. Véase Blatrix y otros, supra; ibid., Presse Med., 77, 159-161 (1969); M. Steinbuch y otros, Vox. Sang. 13, 103 (1967). Aparentemente, ésta no está totalmente desprovista de actividad anticomplemento, ya que debe ser administrada cuidadosamente y se producen reacciones en algunos pacientes. La cortisona puede ser administrada antes de la inyección para eliminar estas reacciones, pero la eliminación incompleta aparente de la actividad anticomplemento podría parecer perjudicial para su extendida



utilización.

Los efectos sobre la actividad anticomplemento de la reducción de enlaces disulfuro de gamma-globulina seguida por reacción con yodoacetamida han sido investigados en la técnica anterior. S. Barandun y otros, supra, han encontrado que el tratamiento de una solución al 7% de gamma-globulina con cisteamina 0,2M, seguida por yodoacetamida 0,2M, daba como resultado una pérdida casi completa de actividad anticomplemento mientras que el tratamiento con cisteamina o con yodoacetamida sólo no disminuye significativamente la actividad anticomplemento. A causa de la toxicidad de la yodoacetamida, estos investigadores no prosiguieron con este intento utilizando una gamma-globulina intravenosa. Similarmente, Wiederman y otros, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 609-613 (1963), mostraron que el tratamiento de gamma-globulina con mercaptoetanol 0,1M, seguido por diálisis prolongada frente a yodoacetamida 0,02 M dió como resultado una solución que no fijaría complemento al ser mezclada con antígeno. La actividad anticomplemento tanto de la gamma-globulina no tratada como de la gamma-globulina tratada estaba ausente cuando fue ensayada por su método de análisis insensible. Estos investigadores tampoco informaron de ningún intento de producir una gamma-globulina intravenosa por este método. La técnica anterior ha de-

412551



mostrado ampliamente que el mercaptoetanol, J. B. Fleischman y otros, Arch., Biochem. y Biophys. Supp. 1, 174-180 (1962) y la mercaptoetilamina, G. M. Edelman, J. Am. Chem. Soc, 81, 3155 (1959), en altas molaridades, son
5 capaces de reducir enlaces disulfuro intercadenas de la gamma-globulina. Los enlaces disulfuro que son más inestables frente a la reducción con mercaptano resultan estar relacionados con la fijación de complemento, mientras que los enlaces disulfuro que son más resistentes a la
10 reducción por mercaptano resultan estar relacionados con la interacción con antígenos. Véase P. H. Schur y otros, J. Exp. Med., 120, 531 (1964). Las desventajas inherentes a la utilización de altas concentraciones (0,1-0,5 M) de mercaptanos para la reducción de enlaces disulfuro intercadenas en gamma-globulina son eliminadas empleando como
15 agente reductor concentraciones limitadas de ditioneitol (DTT). Véase W. W. Cleland, Biochem. 3, 480 (1964). Dado que el DTT es oxidado irreversiblemente para formar un anillo estable de seis miembros, pueden emplearse cantidades casi estequiométricas de este agente reductor y se evita la utilización de un gran exceso de mercaptano. Se ha logrado una reducción virtualmente completa de los
20 enlaces disulfuro intercadenas de la gamma-globulina humana mediante la acción de DTT 0,0125 M sobre una solución al 2% de gamma-globulina. Véase P. Gunewardena y
25



5 otros, Biochem. Journ. 99, 8 (1966). Sin embargo, éstos no han informado cual es la consecuencia que dicha reducción y la subsiguiente alcoholilación con yodoacetamida tuvieron sobre los niveles o concentraciones de anticuerpos.

10 No obstante estas extensas investigaciones acerca de la posibilidad de modificar seroglobulina inmune de manera que se eliminase la actividad anticomplemento, se cree que no se conoce ninguna seroglobulina inmune modificada comercialmente aceptable, que : (a) esté sustancialmente libre de actividad anticomplemento tanto real como latente, (b) tenga sustancialmente la semivida biológica y la actividad anticuerpos de la seroglobulina inmune no modificada, y (c) esté libre de productos de reacción no proteínicos y sea sustancialmente pura, in
15 yectable por vía intravenosa.

20 De acuerdo con este invento, se crean composiciones farmacéuticas adaptadas para ser administradas por vía intravenosa que comprenden una nueva seroglobulina inmune modificada, sustancialmente pura e inyectable por vía intravenosa, que está sustancialmente libre de actividad anticomplemento real y latente, y que tiene sustancialmente la semivida biológica y la actividad anticuerpos de la seroglobulina inmune no modificada.
25 da.

412551



Las composiciones farmacéuticas de este invento comprenden, en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable adaptado para administración por vía intravenosa, una nueva seroglobulina inmune modificada, sus
5 tancialmente pura e inyectable por vía intravenosa que tiene sustancialmente todos los enlaces disulfuro intercadenas enlazando cadenas pesadas y cadenas ligeras y hasta un total de alrededor de 4 enlaces disulfuro reemplazados por pares de grupos $-S-CH_2CONH_2$, permaneciendo
10 unidas las cadenas ligeras con las cadenas pesadas mediante asociación no covalente de manera que el peso molecular aparente en disolventes no disociadores es sustancialmente el mismo que el de la seroglobulina inmune no modificada. Dicha seroglobulina está sustancialmente
15 libre tanto de actividad anticomplemento real como de actividad anticomplemento latente y tiene sustancialmente la semivida biológica y la actividad anticuerpos de la seroglobulina inmune no modificada, según se determina por ensayos serológicos, y es producida mediante
20 reducción selectiva de sustancialmente la totalidad de los enlaces disulfuro intercadenas y hasta un total de alrededor de 4 enlaces disulfuro con ditiotreitól diluido; alcoholación de los grupos mercapto así producidos de la seroglobulina inmune reducida con yodoacetamida;
25 y separación de la seroglobulina inmune alcoholada des-

412551



de los productos de reacción no proteínicos. La seroglobulina así modificada y purificada es administrada, en el método del aspecto de uso de este invento, por vía intravenosa en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adaptado para administración por vía intravenosa.

Haciendo referencia a los dibujos:

La figura 1 es un gráfico que muestra la relación que existe entre el número de grupos -SH bloqueados y la concentración anticomplemento resultante de la nueva seroglobulina inmune modificada cuando la reacción de modificación se lleva a cabo con diversas concentraciones de ditiotreitol y con diferentes tiempos de reacción; y

la figura 2 es un gráfico que compara la distribución de pesos moleculares mediante cromatografía por permeación en gel de la seroglobulina inmune de partida empleada en el Ejemplo 1(b) con la de la nueva seroglobulina inmune modificada, de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla.

La nueva seroglobulina inmune modificada inyectable de este invento se caracteriza por estar sustancialmente inalterada en las mediciones físicas y en las funciones biológicas, excepto en la actividad anticomplemento, pero por ser químicamente distinguible por

412551

12



la sustitución de sustancialmente todos los enlaces disulfuro intercadenas y un total de hasta alrededor de 4 enlaces disulfuro con un número igual de pares de grupos -S-CH₂CONH₂, estando sustancialmente inalterada por lo demás en sentido químico la molécula de ISG. La reducción de estos enlaces disulfuro específicos y la subsiguiente alcoholación de los grupos mercapto así producidos elimina sustancialmente la actividad anticomplemento. La reducción de los grupos disulfuro es necesaria para la eliminación de la actividad fijadora de complemento y la alcoholación de los grupos mercapto así producidos excluye la nueva aparición de actividad anticomplemento. Dado que las reacciones de reducción y alcoholación selectivas de este invento afectan a los enlaces disulfuro intercadenas y dejan enlaces disulfuro intracadenas sustancialmente inalterados, la molécula de proteína no es fragmentada y la potencia anticuerpos de la seroglobulina inmune modificada permanece esencialmente intacta. Al retener inalterado el resto de la molécula sustancialmente retiene también la semivida biológica de la seroglobulina inmune modificada después de su infusión en seres receptores humanos.

Material de partida

25

El material de partida para el procedimiento

3-3-73

412551

12



to de este invento es seroglobulina inmune humana no modificada (ISG).

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones el término "seroglobulina inmune" es utilizado para definir la sustancia también denominada en la bibliografía de diversos modos como gamma-globulina, γ -globulina, IgG e inmunoglobulina G. Consiste predominantemente y de modo preferible en al menos aproximadamente 85% de la especie 7S de gamma-globulina, que tiene un peso molecular de aproximadamente 160.000. Cualquier resto es preferiblemente de la especie 9S, con un peso molecular de alrededor de 300.000. Se pueden emplear seroglobulinas tanto inmunes normales como hiper-inmunes, por ejemplo seroglobulinas inmunes frente al tétano y a la rabia, siendo el producto modificado ISG inmune e hiperinmune, respectivamente. Por lo tanto, un material de partida apropiado para el procedimiento de este invento es Fracción II de Cohn, figuras 5 y 6. Véase Cohn, E. J. y otros, J. Am. Chem. Soc. 68 459 (1946); ibid., 71, 541 (1949).

La Fracción II, según estudios de ultracentrifugación, es predominantemente (en alrededor de 85%) la especie 7S (constante de sedimentación de 7) o gamma-globulina con un peso molecular medio de 160.000.

25
3-3-73

12



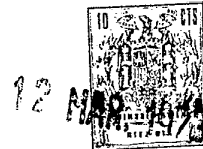
412551

La proteína restante es esencialmente material 9S con un peso molecular de aproximadamente 300.000. Una pasta húmeda de Fracción II (con aproximadamente 30% de sólidos) es liofilizada comunmente para obtener polvo seco de ISG que luego es disuelto y preparado para inyección intramuscular en forma de una solución estéril al 16,5%. O bien la pasta húmeda de Fracción II o bien el polvo seco ISG (antes o después de disolverse en un vehículo acuoso apropiado) constituyen un material de partida apropiado para el procedimiento de este invento.

La gamma-globulina obtenida por cualquier procedimiento que tenga esencialmente la misma composición de componentes proteínicos que se encuentra en la Fracción II de Cohn puede utilizarse como material de partida para el presente procedimiento de modificación química. El plasma sanguíneo o suero completo son dejados también esencialmente libres de actividad anticomplemento por el presente procedimiento de modificación química.

Tanto la seroglobulina inmune normal como la seroglobulina hiperinmune pueden emplearse como materiales de partida. Tal como es bien sabido, esta última es producida a partir de plasma o suero obtenidos de donantes seleccionados que tienen concentraciones mucho mayores de un anticuerpo específico que la que se

412551



encuentra normalmente en la población media. Estos do-
nantes o han sido recientemente inmunizados con una va-
cuna particular o se han recuperado recientemente de
una infección o enfermedad. Estos sueros o plasmas de
5 alta concentración son almacenados y sometidos a los
métodos usuales de fraccionamiento según Cohn hasta el
punto de aislar Fracción II. Los patrones de anticuerpos
de la Division of Biological Standards (DBS) para sero-
globulinas hiperinmunes están basados actualmente en
10 productos que han de ser administrados por vía intra-
muscular. Estos patrones están basados en la suposición
de que se administrara una dosis intramuscular normali-
zada de la globulina reconstituida (1-10 cm³). A causa
de que la cantidad de anticuerpos requerida para lograr
15 una respuesta inmunológica deseada es sustancialmente
menor cuando se administra intravenosamente, resultará
evidente que la dosis I.V. será sustancialmente menor
que la dosis I.M. que produzca la misma concentración
de anticuerpos del suero. Por lo tanto, la dosis de ISG
20 intramuscular y de seroglobulina hiperinmune deberá ser
mayor que la requerida para lograr la misma concentra-
ción de anticuerpos del suero cuando se administra por
vía intravenosa globulina con la misma actividad anti-
cuerpos.

25 La pasta húmeda o el polvo liofilizado de

412551

12



partida son disueltos en un volumen de agua, preferible-
mente una solución acuosa de glicina y NaCl, para propor-
cionar una solución de proteína con la concentración de-
seada, usualmente 1 a 20%, por ejemplo 3, 5, 10 y 16,5%,
5 preferiblemente alrededor de 5%. Sorprendentemente, mien-
tras que soluciones de ISG no modificada son máximamente
estables en altas concentraciones, por ejemplo de 16-18%,
soluciones de la nueva ISG modificada de este invento
son estables en concentraciones sustancialmente menores,
10 por ejemplo de 10%. Glicina y NaCl, si bien no son esen-
ciales, son incluidas preferiblemente para ayudar a es-
tabilizar la solución de proteína. La glicina puede es-
tar en cualquier concentración hasta de aproximadamente
1,0 M. La solución de NaCl es preferiblemente de apro-
15 ximadamente 0,075 M. Después de que ha sido disuelta la
proteína, la solución es ajustada al deseado pH débil-
mente alcalino, por ejemplo de aproximadamente 7,2 a 9,
preferiblemente de aproximadamente 8,0 a 8,6, y del mo-
do más preferible de aproximadamente 8,0 a 8,2, mediante
20 la adición de hidróxido de sodio u otra base. Si la so-
lución no es transparente en esta etapa, preferiblemente
es clarificada antes de la etapa de reducción.

Etapa de reducción.

25 En la primera etapa del procedimiento de

412551



este invento, los enlaces disulfuro intercadenas de la seroglobulina inmune de partida son reducidos con ditio-
treitol. Esto se logra convenientemente reduciendo un
total de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4, prefe-
5 riblemente 2,5 a 4, y de modo más preferible alrededor
de 2,8 a 3,8, enlaces disulfuro con al menos alrededor
de 2,5, por ejemplo 2,5 a 50, preferiblemente alrededor
de 4-6, más preferiblemente alrededor de 5-6, equivalen-
tes molares del agente reductor.

10 Tal como se muestra en la figura 1, las ac
tividades anticomplemento real y latente pueden ser eli-
minadas por reducción selectiva seguida por alcoholación
de aproximadamente tres de los enlaces disulfuro inter-
cadenas por molécula de ISG. La reducción y la alcohola-
15 ción de aproximadamente un enlace disulfuro no tienen
efecto demostrable sobre la actividad de fijación de com
plemento de la seroglobulina inmune. La reducción de un
promedio de 2,5 grupos disulfuro reduce drásticamente la
actividad anticomplemento. Sin embargo, para eliminar la
20 actividad anticomplemento sustancialmente de modo comple
to se requiere usualmente la reducción de aproximadamente
2,8 o más grupos disulfuro. La reducción de tres a cua-
tro enlaces disulfuro no es perjudicial y dicho nivel de
reducción y alcoholación asegura que se logra siempre la
25 deseada eliminación completa de actividad anticomplemento

412551



real y latente sin causar reducción de los enlaces disulfuro intracadenas menos reactivos que son esenciales para la actividad biológica. La reducción y la alcoholación de más de cuatro enlaces disulfuro no tienen efectos beneficiosos adicionales sobre la gamma-globulina para utilización por vía intravenosa y, en realidad, dan como resultado una destrucción parcial o completa de la función biológica.

La reducción selectiva deseada de sustancialmente la totalidad de los enlaces disulfuro intercadenas se logra por una combinación de la concentración de ditiotreitól en la mezcla de reacción, la proporción molar de ditiotreitól a proteína de partida y tiempo de reacción, temperatura, y pH.

La etapa de reducción se lleva a cabo a la temperatura ambiente o con calentamiento o enfriamiento suave, por ejemplo de aproximadamente 0-40°C, preferiblemente 20 a 35°C, del modo más preferible a la temperatura ambiente. A temperaturas por debajo de la temperatura ambiente, se requieren concentraciones mayores de ditiotreitól para lograr el mismo grado de reducción. Análisis indirectos muestran que a la temperatura ambiente, a pH 8,2 y en una concentración de proteína de 5% ha reaccionado aproximadamente 60% del DTT (a 0,0015M) en 10 minutos y 65% en 60 minutos. Estos datos indican

412551



que la extensión de la reacción bajo una serie dada de condiciones de pH y concentraciones de proteína y DTT es esencialmente independiente del tiempo de reacción. Por lo tanto, la reacción se puede llevar a cabo durante cualquier período de tiempo conveniente, por ejemplo durante aproximadamente dos minutos hasta dos horas o un tiempo más largo. A temperaturas por encima de la temperatura ambiente, deberá emplearse la cantidad de ditiotreitól requerida teóricamente para lograr el grado de reducción deseado o, si se emplea un exceso, el curso de la reacción deberá ser vigilado y terminado por destrucción del agente reductor en exceso cuando se haya producido el número deseado de grupos -SH.

La reducción se lleva a cabo preferiblemente a un pH débilmente alcalino, por ejemplo de aproximadamente 7,2-9, preferiblemente de aproximadamente 8-8,6. A pH menores, la velocidad de reacción tanto para agentes reductores como alcoholantes disminuye marcadamente. Por lo tanto, a un pH por debajo de 8, se requieren temperaturas algo mayores, tiempos de reacción más largos y/o concentraciones mayores de ditiotreitól. Un pH significativamente mayor tiende a desnaturalizar la seroglobulina inmune. Se emplea preferiblemente un tampón fisiológicamente aceptable para mantener el pH deseado ya que la eliminación completa subsiguiente es

412551



menos crítica.

El ditiotreitól puede ser añadido en forma de una solución a la solución proteínica, o viceversa, o en forma de un sólido a la solución proteínica. Alternativamente, y de modo menos deseable, la proteína puede ser disuelta en la solución de ditiotreitól o la proteína y el ditiotreitól pueden ser mezclados en seco y luego disueltos simultáneamente en el disolvente de reacción acuoso en las concentraciones deseadas de proteína, por ejemplo al menos alrededor de 1%, preferiblemente alrededor de 5-18%.

El curso de la reacción puede ser vigilado, si se desea, vigilando la mezcla de reacción en cuanto a ditiotreitól residual. Cuando ya no se está consumiendo agente reductor, la reacción está completa.

La reacción puede realizarse convenientemente en aire. Esto da como resultado la autooxidación de una proporción secundaria de ditiotreitól, que es compensada por la utilización de una proporción molar mayor de la teórica. Si se desea, la reacción puede realizarse también en una atmósfera inerte, por ejemplo de nitrógeno.

La proporción molar de ditiotreitól a proteína empleada depende en parte de la concentración de proteína de la mezcla de reacción, del pH, del tiempo de

412551

12



reacción, de la temperatura de reacción y de la atmósfe-
ra de reacción. Se requiere teóricamente al menos un
equivalente molar de DTT para reducir un enlace disulfu-
ro por mol de proteína y para producir dos grupos SH.
5 Por lo tanto, la cantidad mínima teórica de ditiotreitól
requerida para reducir cada enlace disulfuro es al menos
de un equivalente molar. Dado que, tal como arriba se
ha indicado (véase también la figura 1), se requiere la
reducción de aproximadamente tres enlaces disulfuro y
10 la subsiguiente alcoholización de los grupos SH para la eli-
minación de la actividad anticomplemento, se requieren
al menos tres equivalentes molares de DTT para eliminar
sustancialmente la actividad anticomplemento, incluso
bajo condiciones óptimas. En el procedimiento de este
15 invento, se emplean aproximadamente 2,5 a 50 equivalen-
tes molares, preferiblemente al menos alrededor de 3 y
usualmente menos de 10, por ejemplo 4-6, del modo más
preferible alrededor de 5, equivalentes molares de di-
tiotreitól para lograr la reducción deseada en un perio-
do de tiempo razonable en las condiciones preferidas de
20 concentración de proteína, de pH y de temperatura de
reacción.

Suponiendo un peso molecular medio de
160.000, la molaridad de la solución de proteína al 5%
25 de partida preferida es aproximadamente 3×10^{-4} M. Por

3-3-73

412551



5 lo tanto, para lograr el nivel deseado de reducción de disulfuro, deberá añadirse suficiente cantidad de ditiotreitól a la solución al 5% de proteína para llevar su concentración desde aproximadamente 5×10^{-4} hasta 25×10^{-4} M, preferiblemente a alrededor de 15×10^{-4} M.

10 La reacción de reducción se puede llevar a cabo convenientemente en aire, y en los ejemplos seguidamente descritos, este aire es la atmósfera de reacción. Sin embargo, dado que una porción del ditiotreitól es oxidada por el aire, pueden emplearse cantidades más próximas a las teóricas de ditiotreitól si la etapa de reducción se lleva a cabo bajo nitrógeno o bajo otra atmósfera inerte.

15 Ya que la etapa de reducción puede terminarse en cualquier momento mediante la destrucción del ditiotreitól que queda en la mezcla de reacción, bajo la mayor parte de las condiciones de reacción una cantidad de ditiotreitól sustancialmente por encima de la teóricamente requerida para lograr el grado de reducción deseado, puede emplearse por ejemplo 5-1.200%, preferiblemente 10-100% de exceso, terminando la reacción cuando se ha logrado el grado deseado de reducción. Cuando se utilizan excesos molares muy grandes de ditiotreitól, se prefiere una temperatura de reacción más baja, por ejemplo de 0-5°C, y/o un pH más bajo, por ejemplo de

20

25

412551



7,2-7,8 para mantener la selectividad de la reacción. Cuando la molaridad del ditiotreitól es menor de aproximadamente $1,6 \cdot 10^{-3}M$, la reducción de solución de proteína al 5% puede realizarse usualmente hasta durante alrededor de una hora antes de que se efectúe la reducción de más de tres grupos disulfuro por molécula. Con aproximadamente $1,6-1,8 \times 10^{-3}M$, la reacción debe ser terminada usualmente en el espacio de aproximadamente 30 minutos. Con mayores concentraciones de ditiotreitól, por ejemplo de $2,0-2,5 \times 10^{-3}M$, la reacción deberá estar terminada en el espacio de 5-15 minutos. Estos tiempos de reacción son reducidos correspondientemente a temperaturas mayores que la temperatura ambiente y viceversa a temperaturas menores que la temperatura ambiente. También, con otras concentraciones de proteínas diferentes de 5% y con valores de pH diferentes de alrededor de 8,0 a 8,6 se requerirá asimismo un ajuste del tiempo de tiempo de reacción cuando se utiliza ditiotreitól en exceso.

Lo anterior supone que la molaridad de la solución de proteína es tal que la cantidad de ditiotreitól presente en la mezcla de reacción está en exceso con respecto a la requerida para reducir un promedio de cuatro grupos disulfuro por molécula, que es el máximo reducido en el procedimiento de este invento. Si

412551

12



se desea, la cantidad exacta de DTT requerida para reducir los alrededor de tres enlaces disulfuro que se prefieren, por ejemplo de 2,8 a 3,8 enlaces, y de este modo producir un promedio de 5,6 a 7,6 grupos SH por molécula bajo las condiciones de reacción seleccionadas, puede ser determinada con una porción alícuota de la ISG de partida. En dicho caso, la extensión de formación de grupos SH será esencialmente independiente del tiempo de reducción.

El ditiotreitól deberá estar presente usualmente en la mezcla de reacción de una concentración de al menos $5,0 \times 10^{-4}$ M y usualmente menor de 1×10^{-2} M, por ejemplo alrededor de $1,2 \times 10^{-3}$, preferiblemente $1,2-1,8 \times 10^{-3}$ M, cuando se reduce una solución de proteínas aproximadamente al 5% durante un corto tiempo a alrededor de la temperatura ambiente. La cantidad requerida de ditiotreitól para producir esta molaridad inicial puede ser añadida de una sola vez o de manera continua o discontinua en el curso de la reacción.

La relación entre la concentración de DTT y el tiempo de reacción está ilustrada en la figura 1 de los dibujos, que muestra el resultado de reducir una solución al 5% de seroglobulina inmune con DTT a diversas concentraciones en la mezcla de reacción. Tal como

412551

12



se muestra en los dibujos, con ISG al 5% la reducción del mínimo de 2,5 enlaces disulfuro para formar 5 grupos SH por molécula no puede lograrse con una molaridad de DTT menor de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3} M$, que es alrededor de 1,3 veces la cantidad teórica requerida, independientemente del tiempo de reacción. Para producir 6 grupos SH en el espacio de una hora se requiere una molaridad de al menos aproximadamente $1,6 \times 10^{-3} M$, alrededor de 1,67 veces la cantidad teórica. En la curva superior de la figura, el número de grupos SH formados durante la reducción fue determinado a partir del contenido de carboximetilcisteína de un producto hidrolizado ácido de la ISG químicamente modificada. Durante la hidrólisis con ácido los residuos de cisteína alcoholada con yodoacetamida son convertidos en carboximetilcisteína de manera que el análisis cuantitativo de este residuo da el número de grupos mercapto alcoholados. En la curva inferior, se utilizó ^{14}C -yodoacetamida para bloquear los grupos mercaptos de manera que podría obtenerse el número de grupos alcoholados a partir de mediciones radioactivas. Las concentraciones de carboximetilcisteína son algo mayores y se cree que son cuantitativamente más exactas debido a la naturaleza de los experimentos.

Un equivalente químico evidente del ditio-

412551

treitol de este invento es su diastereoisómero, ditio-eritritol, y en cada uno de los ejemplos que se dan seguidamente, éste último puede sustituir al primero.

5 El producto de la etapa de reducción, es decir seroglobulina inmune reducida pero por lo demás no modificada sustancialmente, que tiene sustancialmente todos los enlaces disulfuro intercadenas y hasta un total de 4 enlaces disulfuro reducidos para formar pares de SH, es luego convertido, usualmente sin purificación
10 ni aislamiento intermedios, en un producto final estable en la etapa de alcoholación.

Etapa de alcoholación

15 En la etapa de alcoholación, el producto de la etapa de reducción es alcoholado con yodoacetamida para producir la nueva seroglobulina inmune modificada de este invento. En esta etapa, se emplea suficiente cantidad de yodoacetamida para reaccionar con todo el ditiotreitol no utilizado y para alcoholar todos los
20 grupos SH presentes en el producto reducido.

Esta etapa se lleva a cabo usualmente en la mezcla de productos de reacción de la etapa de reducción. Sin embargo, si se desea, la proteína reducida puede ser aislada, por ejemplo, por precipitación y
25 puede emplearse un nuevo disolvente acuoso.

412551

12



Para alcoholilar totalmente el producto de la etapa de reducción se requieren usualmente al menos dos equivalentes molares de yodoacetamida, calculado con relación al ditiotreitól empleado en la etapa de reducción. Preferiblemente, se emplea un exceso alrededor de 10% molar o mayor para asegurar la completa alcoholilación de todo el DTF residual y la conversión de todos los grupos SH de la proteína en grupos $-S-CH_2CONH_2$. Por ejemplo, si se emplea ditiotreitól en una concentración inicial de molaridad 15×10^{-4} en la mezcla de reacción, la molaridad inicial preferida de la yodoacetamida en la mezcla de reacción es de aproximadamente 33×10^{-4} . Pueden emplearse excesos molares mayores, por ejemplo hasta de 20 equivalentes molares, sin resultados perjudiciales, dado que la yodoacetamida en exceso es separada del producto alcoholilado después de la etapa de alcoholilación, por ejemplo por precipitación de la proteína o por diálisis.

Las condiciones de reacción son sustancialmente las mismas que las que se emplean en la etapa de reducción, excepto que usualmente se utilizan tiempos de reacción algo más largos, por ejemplo de 1 a 2 horas. La yodoacetamida puede ser añadida en forma de un sólido o en forma de una solución. Igual que en la etapa de reducción, el curso de la reacción puede ser vigilado, en

412551

12



este caso analizando en cuanto a grupos SH libres. Dado que la presencia de grupos SH libres en la molécula de proteína puede permitir la nueva aparición de actividad anticomplemento, el producto de reacción deberá estar lo más libre que sea posible de grupos SH, a saber con una cantidad de éstos no mayor de vestigios. Dicha completa alcoholación de grupos SH impide también la subsiguiente aglomeración de moléculas de gamma-globulina.

Aunque la alcoholación del grupo SH producida por reducción de los enlaces disulfuro intercadena se logra en el procedimiento de este invento con yodoacetamida para producir pares de grupos $-SCH_2CONH_2$, los grupos SH pueden ser también bloqueados alcoholando la ISG reducido con otros agentes de alcoholación para producir una ISG modificada que tiene sustancialmente las mismas propiedades físicas y biológicas que aquella en que enlaces disulfuro intercadena disociados son reemplazados por pares de grupos $-SCH_2CONH_2$. Se obtendrá una ISG modificada que tendrá sustancialmente todos los enlaces disulfuro intercadena reemplazados por pares de otros grupos $-SR$ y tendrá un peso molecular aparente esencialmente igual al de la seroglobulina no modificada, estará sustancialmente libre de actividad anticomplemento, tendrá grupos SR que serán químicamente estables e incapaces de permitir la nueva formación de en-

412551

12



laces disulfuro, y tendrá sustancialmente la semivida biológica y la actividad anticuerpos de la seroglobulina inmune no modificada. El R en el grupo tioéter puede ser alcoholo inferior, por ejemplo metilo, etilo y propilo; N,N-di-(alcohol inferior)-carbamido- alcoholo inferior, por ejemplo N,N-dietilcarbamidometilo ($-\text{CH}_2\text{CONEt}_2$); alcoxi inferior-carbonil-alcoholo inferior, por ejemplo etoxicarbonilmetilo ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) etoxicarboniletilo ($-\text{CHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$); carboxi-alcoholo inferior, por ejemplo

10 $\begin{array}{c} | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

carboximetilo ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), carboxietilo ($-\text{CHCO}_2\text{H}$); ciano-

$\begin{array}{c} | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

-alcoholo inferior, por ejemplo $-\text{CH}_2\text{CN}$; β -amino-alcoholo inferior, por ejemplo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; y benzoil-alcoholo inferior, por ejemplo $-\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$. La alcoholación de los grupos SH para dar grupos SR, en donde R es alcoholo inferior puede lograrse tratando la seroglobulina inmune reducida, por ejemplo, con O-metilisourea bajo condiciones alcalinas suaves, en cuyo caso se forman

20 grupos $-\text{SCH}_3$. Alcoholo inferior y alcoxi inferior, tal como aquí se utilizan, significan grupos con 1 a 4 átomos de carbono. Pueden formarse otros alcoholtioéteres sustituidos empleando la apropiada N,N-dialcohol- α -haloacetamida, por ejemplo $\text{ClCH}_2\text{CON}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$; éster haloacético, éster α -halopropiónico, por ejemplo $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$,

25

412551



$\text{BrCHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$; ácido haloacético, ácido α -halopropiónico,
 $\begin{array}{c} | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

por ejemplo $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{H}$, BrCHCO_2H ; haloacetónitrilo, por
 $\begin{array}{c} | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

5

ejemplo ICH_2CN , alcoholeniminas, por ejemplo $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$,
halogenuro de fenacilo, por ejemplo cloruro de fenacilo.
Las reacciones de alcoholación se llevan a cabo en con-
diciones débilmente alcalinas.

10

Aislamiento de la ISG modificada.

Con el fin de producir un producto farma-
céuticamente aceptable adaptado para administración por
vía intravenosa, es necesario separar la nueva ISG modi-
ficada de los productos de reacción no proteínicos y de
los reaccionantes. Esto puede efectuarse de una variedad
de maneras, por ejemplo por cromatografía por intercam-
bio de iones, cromatografía por permeación en gel, ultra-
centrifugación o, preferiblemente, por diálisis, o por
precipitación de la ISG modificada, por ejemplo con un
disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo me-
tanol, etanol, etc. Cuando se obtiene una solución más
diluida de lo deseado de la ISG modificada, puede utili-
zarse eficazmente también ultrafiltración para concentrar
la solución a la concentración de proteína deseada.

3-3-73

412551

12



En un método preferido, preferiblemente después de diluir la solución de proteína con agua hasta una concentración de proteína de alrededor de 1,5%, la seroglobulina inmune modificada es precipitada con etanol aproximadamente bajo las mismas condiciones que las del procedimiento bien conocido de Cohn para obtener Producto Precipitado II a partir de Producto Sobrenadante III. Este precipitado es recogido y lavado, preferiblemente al menos dos veces con solución tampón etanólica bajo condiciones de pH y temperatura y con concentraciones de etanol que no vuelvan a disolver la proteína pero que eliminen todas las cantidades commensurables de reaccionantes residuales y de productos no proteínicos. Luego, el material es secado de una manera convencional, por ejemplo por el método empleado para secar la Fracción II de Cohn y está dispuesto para ser envasado de modo estéril para utilización por vía intravenosa después de reconstituir a la concentración deseada de proteína en un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para administración por vía intravenosa.

En otro método preferido, se emplea una solución de ISG concentrada por ejemplo al 15-18%, como material de partida y el producto de la etapa de alcoholación es dializado hasta quedar libre de componentes

412551

12



no proteínicos del producto de reacción. La ISG modificada resultante puede ser filtrada de modo estéril y cargada de modo estéril en recipientes, por ejemplo viales de 10 cm³, para utilizarse tal como está o para liofilización. Alternativamente, o con el fin de asegurar una eliminación completa de reaccionantes, la solución dializada puede ser tratada ulteriormente tal como arriba se describe, a saber precipitación de la ISG modificada, lavado del precipitado y reconstitución a una concentración deseada de proteína en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando se obtiene una solución más diluida de lo deseado de la ISG modificada se puede utilizar también eficazmente ultrafiltración para concentrar la solución a la deseada concentración de proteína.

Nueva seroglobulina inmune.

La nueva gamma-globulina de este invento está sustancialmente libre de actividad anticomplemento, tanto inmediata como latente. Su peso molecular está sustancialmente inalterado. Sedimenta principalmente a 7S en la ultracentrífuga, con alrededor de 10 a 15% del componente 9S que también está presente en la gamma-globulina no modificada producida por fraccionamiento según Cohn. Su espectro de cromatografía por fil-



tración en gel sobre glóbulos de poliacrilamida (Bio-
-Gel^R p 300) en tampón "tris", pH 8,0, muestra un máxi-
mo principal que comprende 80-90% de la proteína total
con un peso molecular de 160.000 con poco o ningún frag-
5 mento de menor tamaño. Sin embargo, la cromatografía en
gel en condiciones disociativas, tales como en ácido
acético 1 M, muestra una cantidad significativa de ca-
denas ligeras (o de dímero de cadena ligera), indicando
que los enlaces disulfuro que unen las cadenas ligeras
10 con el dímero de cadena pesada son rotos por el proce-
dimiento de este invento. Ya que estos enlaces disul-
furo interseccionan la cadena pesada cerca de la región
que se piensa que contiene el lugar de fijación de com-
plemento (la región de "articulación"), el cambio de con-
15 figuración inducido por su reducción y alcoholación se
cree que es responsable de la pérdida de actividad anti-
complemento tanto real como latente. La concentración
de anticuerpos no es significativamente diferente de la
de la gamma-globulina no modificada de partida, es decir
20 es globulina normal o hiperinmune, por ejemplo globulina
hiperinmune para el tétano o para la rabia, dependiendo
de la concentración de anticuerpos de la globulina no
modificada de partida. Las moléculas de anticuerpos son
bivalentes, según se indica por su capacidad de precipi-
25 tar con antígenos. La precipitación cuantitativa con to-

412551

12



5 xoi de tétano indica que se retiene 65-80% de los anticuerpos para el tétano precipitantes después de modificación química de una globulina inmune para el tétano. La nueva ISG transporta protección pasiva contra la toxina de tétano según se confirma por estudios con animales de laboratorio. La supervivencia de semivida de la nueva gamma-globulina químicamente modificada en seres humanos y en animales de laboratorio no es sustancialmente diferente de la de la gamma-globulina no modificada.

10

 En contraste con la gamma-globulina inyectable intravenosa preparada por tratamiento térmico a pH 4,0 o por tratamiento limitado con plasmina, la nueva ISG no fija apreciablemente complemento incluso aunque se aglomere a propósito por tratamiento con calor o con ácido seguido por neutralización. No vuelve a adquirir significativa actividad anticomplementaria cuando es almacenada durante dos años a 5°C en forma de una solución estéril apropiada para administración I.V.

15

20 Aunque los enlaces disulfuro intercadenas entre las cadenas ligeras y las cadenas pesadas son rotos en el procedimiento de este invento, las cadenas ligeras permanecen unidas con las cadenas pesadas por asociación no covalente de manera que el peso molecular aparente del producto reducido y alcoholado permanece

25

412551

12 MAR 1973



sustancialmente inalterado según se determina por filtración en gel y ultracentrifugación en disolventes no disociadores. Sin embargo, el hecho de que estos enlaces disulfuro intercadenas son rotos es demostrado disolviendo el nuevo producto en ácido acético 1 M, en el que las cadenas ligeras son disociadas del resto de la molécula. Cromatografiando la solución resultante y analizando separadamente la absorción de U.V. de la porción del eluato que contiene las cadenas ligeras y pesadas se demuestra que la fracción ligera contribuye en aproximadamente la cantidad teórica (alrededor de 20%) de la absorción total de U.V. del nuevo producto, verificando de este modo que no quedan sustancialmente enlaces disulfuro intercadenas en la nueva ISG químicamente modificada. La nueva ISG modificada de este invento tendrá aproximadamente los mismos niveles anticuerpos o niveles ligeramente menores que la ISG de partida.

Una nueva característica de la ISG modificada de este invento es su ausencia de actividad proteolítica. Se sabe que algunas muestras de ISG forman fragmentos cuando son almacenadas. Dicha fragmentación es debida a digestión proteolítica por una enzima contaminadora que frecuentemente se presume que es plasmina. La fragmentación es indeseable ya que provoca una disminución de la cantidad de anticuerpos activos en solu-

412551

12



5 ción. El procedimiento de este invento disminuye pronun-
ciadamente la actividad proteolítica en ISG hasta nive-
les imposibles de ser detectados o como máximo a niveles
de vestigios. Otros experimentos han mostrado que la gam
ma-globulina químicamente modificada tiene 0,004 unida-
des de caseína/ml (una medida de actividad proteolítica
no específica) comparado con el material de partida que
10 contiene 0,03 unidades de caseína/ml. Por lo tanto, el
nuevo procedimiento de este invento suprime la actividad
proteolítica en la gamma-globulina, lo cual aumenta la es
tabilidad del producto.

15 Es sabido también que el calentamiento de
la ISG provocará aglomeración de moléculas para formar
proteínas de peso molecular mayor y aumentará grandemen-
te la concentración anticomplemento, por ejemplo desde
16 hasta por encima de 500. El procedimiento de este in-
vento elimina esta actividad anticomplemento acrecenta-
da y lleva la actividad anticomplemento hasta aproxima-
damente valores nulos.

20

Administración por vía intravenosa.

25 La ISG modificada de este invento está pro-
yectada principalmente para administración por vía in-
travenosa. Por lo tanto, las realizaciones preferidas de
este invento son composiciones farmacéuticas que compren

3-3-73



den una solución inyectable por vía intravenosa de la ISG modificada de este invento en un vehículo farmacéu-
ticamente aceptable adaptado para administración por
vía intravenosa. La ISG modificada está presente en es-
5 tas soluciones en cualquier concentración, apropiada
para inmediata administración I.V. o después de dilu-
ción a niveles aceptables, por ejemplo con solución sa-
lina isotónica, por ejemplo con solución de proteína
aproximadamente al 1-18%, preferiblemente aproxima-
10 damente al 1-15%, más preferiblemente aproximadamente al
10% para administración inmediata y aproximadamente al
16% para dilución antes de administración. Estas solu-
ciones son estériles y están libres de materia en forma
de partículas. Puede emplearse una variedad de disolven-
15 tes orgánicos para la proteína, por ejemplo agua, agua
tamponada, solución salada al 0,4%, glicina 0,3 molar,
etc. Pueden emplearse los vehículos acuosos convencio-
nalmente empleados para ISG no modificada o para sero-
globulina hiperimmune, excepto materiales que produci-
20 rían una reacción desfavorable después de administración
I.V. La ISG modificada puede ser administrada por vía
intravenosa sólo o en combinación o en unión con otros
productos de la sangre, por ejemplo sangre entera, plas-
ma, fibrinógeno, factores de coagulación y albúmina..

25 En su aspecto de método de uso, este in-

412551

12



5 vento se refiere a la administración por vía intraveno-
sa, usualmente a seres humanos, de una composición far-
macéutica, tal como arriba se describe, que comprende la
nueva ISG modificada de este invento. La composición es
10 administrada de una manera convencional, por ejemplo en
una cantidad que proporciona cantidades terapéuticas ade-
cuadas de anticuerpos. Para una solución al 16,5% de
proteína, aproximadamente 1-25 ml constituyen la dosis
individual acostumbrada. La administración de dosifica-
15 ciones subsiguientes se realiza usualmente en el espacio
de 24-72 horas, dependiendo de la gravedad de la enfer-
medad y del tiempo de exposición a la misma.

 Sin ninguna aclaración adicional, se cree
que un experto en la materia, utilizando la descripción
15 que antecede, puede utilizar el presente invento en su
más plena extensión. Las siguientes realizaciones espe-
cíficas preferidas han de ser consideradas, por lo tan-
to, como meramente ilustrativas.

 Materiales de partida para los siguientes
20 ejemplos del método de modificación química fueron pre-
parados tal como se indica seguidamente:

Método.

 (1) Pasta de Fracción II de Cohn que con-
25 tiene aproximadamente 30% de gamma-globulina fue suspen-

412551



dida a -5°C en un tampón de glicina-solución salina para dar una solución que contenía aproximadamente 5% de gamma-globulina, 2,25% de glicina y 0,45% de cloruro de sodio a un pH de aproximadamente 6,5.

5 (2) Pasta de Fracción Liofilizada II, cuyo contenido de proteína es de aproximadamente 100% de gamma-globulina, fue disuelta a 25°C en tampón de 2,25% de glicina y 0,45% de solución salina, a pH 6,8, para dar una solución final que contenía aproximadamente 5% de proteína.

10 (3) Una solución al 16,5% de seroglobulina inmune en tampón de glicina-solución salina, comercialmente disponible, fue diluida con tampón adicional para dar una solución final que contenía aproximadamente 5% de proteína.

15 La pasta, el polvo o la solución de Fracción II se obtuvieron mediante el fraccionamiento según Cohn de plasma almacenado procedente de donantes humanos normales, o a partir de plasma almacenado de donantes seleccionados que tenían altas concentraciones de un anticuerpo particular, por ejemplo anticuerpos para tétano, rabia
20 o antígeno asociado con hepatitis.

La concentración de proteína fue determinada por espectrofotometría utilizando un coeficiente de extinción específico de

25 $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 13,8 \text{ a } 280 \text{ m}\mu.$

12



412551

Ejemplo 1.

Una solución que contenía 750 g de globulina inmune para tétano, preparada de acuerdo con (1) en 15 litros de tampón de glicina-solución salina, fue calentada a 22°C y el pH fue ajustado a 8,2 mediante la adición de 130 ml de NaOH 1 N. Se añadió una solución que contenía 3,47 g (0,0225 moles) de ditiotreititol (DTT) en 23 ml de tampón de glicina-solución salina para dar una concentración de ditiotreititol de 0,0015 M en la mezcla de reacción. La solución fue agitada durante 15 minutos y luego se añadió una solución que contenía 9,15 g (0,0494 moles) de yodoacetamida (IAM) en 229 ml de tampón de glicina-solución salina, dando una concentración de yodoacetamida 0,0033 M en la mezcla de reacción. El pH de la solución fue mantenido en 8,1 a 8,2 durante las dos horas siguientes por adición de la cantidad de NaOH 1 N necesaria. Luego la mezcla de reacción fue ajustada a un pH de 6,80 por adición de 245 ml de HCl 1 N y fue enfriada a 5°C. La solución fue tratada de las dos maneras siguientes:

(a) Una porción de 50 ml de la mezcla de reacción fue dializada frente a varias cargas de tampón de 2,25% de glicina-0,45% de NaCl, pH 6,80. El producto dializado fue concentrado por ultrafiltración hasta un volumen de alrededor de 25 ml y fue filtrado de modo



estéril a través de una membrana de 0,22 micras. La solución estéril es un producto apropiado para inyección intravenosa a seres humanos y contiene 8,6% de proteína medido por espectrofotometría.

5 (b) El resto de la mezcla de reacción (15
litros) fue diluido con 19,2 litros de agua fría. La gam
ma-globulina modificada químicamente fue recuperada des-
de esta solución por precipitación a 0°C con etanol frío
similar a las condiciones 9 del método de Cohn y la pas
10 ta de gamma-globulina fue recogida por centrifugación.
Luego la pasta húmeda fue lavada con dos porciones de 10
litros de tampón de glicina-solución salina que contenía
suficiente etanol para evitar disolución de la gamma-glo
bulina. Estos lavados eliminaron cualesquiera reacciona
15 ntes residuales atrapados en la gamma-globulina precipi-
tada. Luego la pasta húmeda fue liofilizada para dar 560
g de gamma-globulina seca químicamente modificada. Se pre
paró una solución que contenía aproximadamente 10% de
proteína disolviendo 529 g del polvo en 4,5 litros de
20 tampón de 2,25 % de glicina - 0,45% de solución salina
de pH 6,8. Luego esta solución fue filtrada de modo esté-
ril para dar un producto apropiado para administración
intravenosa a seres humanos. Esta solución de la nueva
ISG modificada puede, por ejemplo, ser cargada de modo
25 estéril en ampollas de 10 cm³ de una sola dosis que lue-

412551



go son cerradas herméticamente de una manera convencional con un tapón de caucho cubierto.

La actividad anticomplemento fue medida por un análisis de dilución normalizado. Típicamente, 5 0,2 ml de diluciones en serie de razón doble de la sustancia de ensayo fueron incubados durante 2 horas a 37°C con dos unidades "completas" de complemento de cobaya en 0,4 ml de solución salina. (Una unidad completa de 10 complemento es la cantidad que provoca una completa hemólisis de 0,4 ml de una suspensión al 1% de eritrocitos de cordero sensibilizado). Después se determinó el complemento residual por adición de 0,4 ml de una suspensión al 1% de eritrocitos de cordero sensibilizado e incubación durante 30 minutos adicionales a 35°C. El grado 15 de hemólisis fue estimado visualmente y la concentración anticomplemento se tomó como la máxima dilución de sustancia de ensayo que dió al menos 50% de hemólisis.

El material de partida para el Ejemplo I tenía una concentración anticomplemento de 1:512 cuando 20 fue ensayado con 10% de proteína mediante este sistema de análisis. El producto modificado químicamente aislado por el método (a) o por el método (b) tenía una concentración anticomplemento de menos de 1:1, por ejemplo, no se observó hemólisis en la muestra no diluída. El 25 producto químicamente modificado de acuerdo con este

412551



invento no fija por lo tanto sustancialmente nada de complemento y, por lo tanto, está sustancialmente libre de actividad anticomplemento.

5 Se encontró por análisis de aminoácidos que el producto del Ejemplo 1 (b) contenía 7,7 grupos -S-CH₂-CONH₂ por molécula de gamma-globulina modificado. Este resultado fue calculado a partir de un producto hidrolizado con ácido del producto utilizando un peso molecular de 160.000 para la gamma-globulina y determinando el número de residuos de carboximetilcisteína
10 por molécula de gamma-globulina. El producto del Ejemplo 1 (b) fue analizado en cuanto a anticuerpos de tétano por la técnica de precipitación cuantitativa. Se encontró que un ml de una solución al 10% del producto
15 precipitaba 163 unidades Lf de toxoide de tétanos, mientras que un ml de una solución al 10% de la gamma-globulina no modificada precipitaba 198 unidades Lf. Por lo tanto había una retención de 82% de los anticuerpos de tétano precipitadores después de modificación química.
20 ca.

La difusión en gel frente a toxoide de tétano y frente a antígeno de Streptococcus del Grupo A mostró sustancialmente el mismo contenido de anticuerpos para el producto modificado químicamente y para el
25 producto de partida no modificado.

412551



El peso molecular del componente principal en la seroglobulina inmune no es afectado por el método de modificación química. En la 2, el espectro de filtración en gel sobre Bio-Gel A-0,5 m del producto del Ejemplo 1 (b) es comparado con el del material de partida no modificado. Esta filtración en gel se llevó a cabo en un tampón "tris" a pH 8,0. Cuando la filtración en gel se lleva a cabo en ácido acético 1 M, el producto del Ejemplo 1 (b) muestra un máximo que contiene aproximadamente 17% de la proteína total que tenía un peso molecular correspondiente a cadenas ligeras libres.

En una solución acuosa a pH 7, el producto del Ejemplo 1 consistía en 83,7% de 6,68S, 14,5% de 9,73 S, y 1,7% de 12,1S cuando fue analizado en la ultracentrífuga. No se detectaron fragmentos que sedimentasen a menos de 6S.

EJEMPLO 2.

Una solución que contenía 190 g de globulina inmune para tétano en 3,54 litros de tampón de glicina-solución salina fue preparada de acuerdo con el Método 2. La solución fue calentada a 22°C y el pH fue ajustado a 8,35 por adición de 45 ml de NaOH 1 N. Esta solución fue tratada con 1,38 g (0,0090 moles) de di-

412551

12 MAR



tiotreitól en 9 ml de tampón de glicina-solución salina y se dejó que la reducción se desarrollase durante 10 minutos. Luego esta mezcla fue alcoholada por la adición de 1,82 g (0,010 moles) de yodoacetamida en 45 ml
5 de tampón de glicina-solución salina. Después de dos horas, el pH de la mezcla de reacción fue reducido a 6,75 por la adición de 50 ml de HCl 1 N. Esta solución de gamma-globulina reducida y alcoholada fue tratada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, método (b).
10 Por lo tanto se obtuvieron de esta manera 156 g de polvo liofilizado, que fueron disueltos en tampón de glicina-solución salina y fueron filtrados de modo estéril para dar una solución al 10% de proteína apropiada para inyección por vía intravenosa. El producto tenía una con-
15 centración anticomplemento de 1:1, mientras que la del material de partida no modificado era de 1:512, realizándose ambos análisis utilizando soluciones al 10% de proteína. Después de almacenar durante 18 meses a 5°C, el producto químicamente modificado tenía una concentra-
20 ción anticomplemento de 1:2. Cuando fue analizado de nuevo a los 19 meses, la concentración era de 1:1.

El análisis en cuanto a aminoácidos de la ISG modificada indicó 6,7 residuos de $-SCH_2CONH_2$ por peso molecular de 160.000. Se obtuvieron espectros de fil-
25 tración en gel sustancialmente iguales a los del produc-

412551



to del Ejemplo 1. El producto químicamente modificado se
dimentó en forma de 80% de 6,84 S, 17% de 9,86 S, y 3%
de 10-11 S en la ultracentrífuga.

5 La ISG modificada fue comparada con el ma-
terial de partida no modificado en cuanto a la capacidad
de conferir protección pasiva a cobayas subsiguientemen-
te combatidas con 100 DIM de toxina de tétanos. Se obser-
vó un punto final de protección pasiva de 50% de 7-3/4
días para material de partida no modificado y de 8-1/2
10 días para el producto químicamente modificado. Los re-
sultados están de acuerdo con el punto final inmunológi-
co aceptado de nueve días para gamma-globulina humana en
cobayas.

15 La semi-vida "in vivo" de la ISG modifica-
da se determinó que era de 2,3 días en cobayas, compara-
do con 2,5 días para el material de partida no modifica-
do.

20 En pacientes agammaglobulinémicos, se en-
contró que el tiempo medio de semi-vida de supervivencia
con plasma de la ISG modificada era de 22,4 días. Las
infusiones eran seguras y bien toleradas.

EJEMPLO 3.

25 A 6 ml de una solución al 17,3% de glohu-
lina inmune a la rabia en tampón de glicina-solución sa-

412551

12



lina se añadieron 15 ml de tampón de glicina-solución salina adicional para dar una solución que contenía 5,04 % de proteína. Quince ml de esta solución fueron calentados a la temperatura ambiente y ajustados a pH 8,2 con NaOH 1 N. La solución fue agitada y tratada con 0,10 ml de una solución 0,225 M de ditiotreitól preparada en tampón de glicina-solución salina. Después de 10 minutos, se añadieron 0,20 ml de yodoacetamida 0,25 M en tampón de glicina-solución salina. El pH, que había disminuido a 8,10, fue aumentado a 8,25 por adición de NaOH 0,1 N. Después de dos horas, la mezcla de reacción fue dializada frente a tampón de glicina-solución salina, pH 6,85, y fue filtrada de modo estéril a través de un filtro de 0,22 micras. La solución de globulina inmune a la rabia químicamente modificada y estéril resultante contenía 3,3% de proteína determinado por vía espectrofotométrica.

Este producto fue ensayado por un análisis de protección "in vivo" de ratón que indicó una concentración numérica algo menor de anticuerpos protectores contra el virus de la rabia (1:1100) que la globulina inmune a la rabia no modificada (1:2000). Debido a las variaciones inherentes al método de bioanálisis, esta diferencia no se considera que es importante. La actividad anticomplemento (en solución al 5%) de la ISG

412551

12



modificada era negativa, comparado con una concentración de 1:32 para la ISG de partida.

EJEMPLOS 4 a 7.

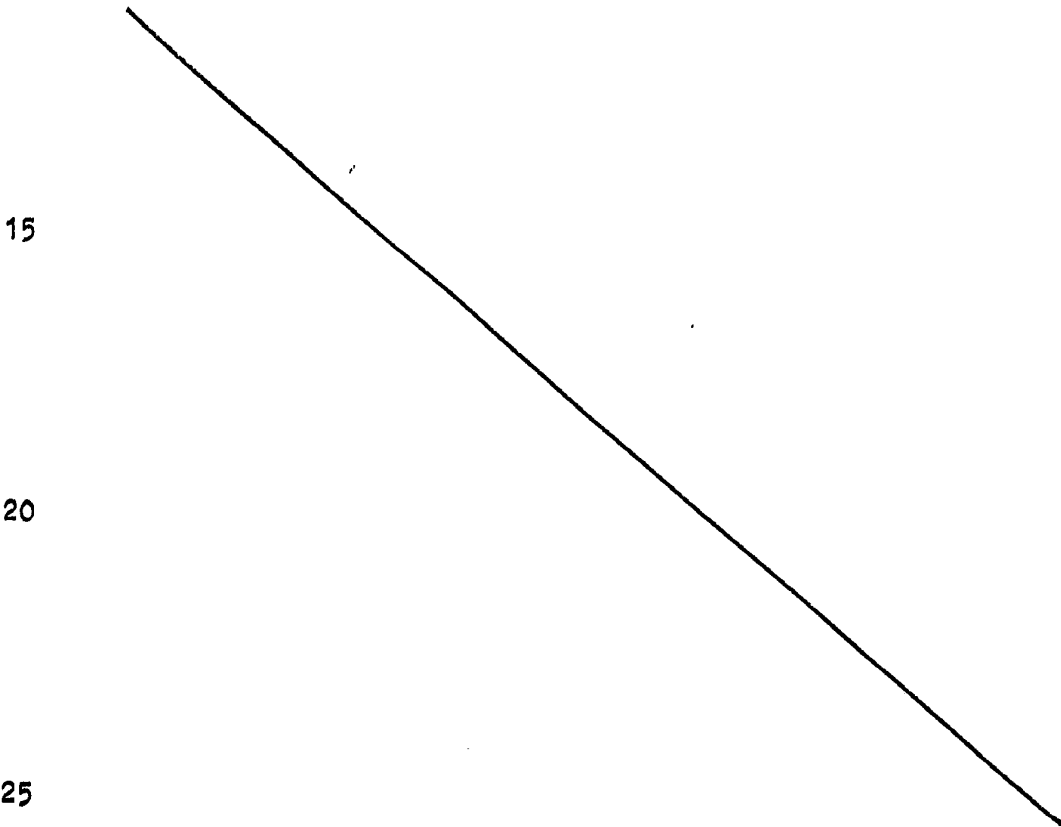
5 Sesenta gramos de pasta de Fracción II fueron disueltos en un tampón de glicina-solución salina de acuerdo con el Método 1 para dar 422 ml de solución que contenía 4,86% de proteína. Esta solución fue ajustada a pH 8,2 y dividida en porciones alícuotas de 40 ml.
10 Cada muestra fue reducida con ditiotreitól (DTT) y alcoholada con yodoacetamida (IAM) tal como se indica en la Tabla. Después de alcoholación durante el tiempo indicado, cada muestra fue dializada frente a tampón de glicina-solución salina hasta quedar libre de reaccionantes
15 no proteínicos y de productos de reacción. Las muestras fueron concentradas a aproximadamente 10% de proteína por ultrafiltración. La filtración estéril a través de un filtro estéril de 0,22 micras proporciona una solución estéril apropiada para administración por vía intravenosa (Muestras 4-7).
20

Cada una de las nuevas muestras fue analizada en cuanto a anticuerpos para el antígeno de Streptococcus Grupo A. Las Muestras 2 a 8 contenían aproximadamente la misma cantidad de anticuerpos que la Muestra número 1 no tratada, mientras que el contenido de anticuer-

412551



pos de la Muestra 9 fue reducido muy marcadamente a un nivel imposible de ser detectado. Las anteriores muestras fueron hidrolizadas con ácido y los productos hidrolizados fueron sometidos a análisis de aminoácidos para determinar el número de grupos $-S-CH_2CONH_2$ por molécula de gamma-globulina. La actividad anticomplemento de las muestras fue determinada por el método descrito en el Ejemplo 1. Los resultados del análisis anticomplemento, de la actividad anticuerpos, y del análisis de aminoácidos están resumidos en la Tabla.



3-3-73

412551

412551



5

10

15

Ejemplo	Muestras	Anticuerpos para	
número	de	antígenos de	
	(SCH ₂ CONH ₂ /	<u>Strep.</u> Tipo A.	
	,6 x 10 ⁻⁵		
A	1	0	+
B	2	3,00	+
C	3	5,78	+
4	4	7,50	+
5	5	7,40	+
6	6	7,27	+
7	7	8,13	+
D	8	0	+
E	9	8,13	(*)

(*) N

20

25

3-3-73

412551

12



Estos resultados indican que la reducción con un nivel de 0,0015 M de ditiotreitól durante 10 minutos, seguida por alcoholilación durante dos horas con yodoacetamida 0,0033 M (Muestra 5) da un producto sustancialmente libre de actividad anticomplemento y que contiene 7,4 grupos $-SCH_2CONH_2$ por molécula de gamma-globulina, sin ninguna disminución aparente del contenido de anticuerpos. La reducción durante 60 minutos (Muestra 6) o durante 5 minutos (Muestra 4) o la alcoholilación durante 30 minutos en lugar de durante 120 minutos (Muestra 7) dió productos esencialmente idénticos a la Muestra 5. Sin embargo, la pérdida de actividad anticomplemento era incompleta utilizando menores niveles de ditiotreitól (Muestras 2 y 3). Aunque la actividad anticomplemento era baja en la Muestra 9 (reducida con alta concentración de DTT durante 60 minutos), la función de anticuerpos fue destruida.

EJEMPLO 8.

Una solución comercialmente asequible de gamma-globulina que consistía en 16,5% de globulina inmune para el tétano fue reducida a la temperatura ambiente con ditiotreitól (0,0075 M) durante una hora y fue alcoholilada con yodoacetamida (0,00825 M) durante dos horas de la manera descrita en el Ejemplo 1. El produc-

412551



to resultante fue dializado frente a diluyente de glicina hasta quedar libre de la porción no proteínica del producto de reacción, fue filtrada de modo estéril y cargada de modo estéril en viales de 10 ml apropiados para administración a seres humanos. Se observaron para muestras testigo y modificadas químicamente respectivamente valores de anticuerpos de tétano de 127 unidades Lf y 110 unidades Lf, y valores de análisis anticomplemento de 1:256 y 1:4. Este método tiene la ventaja de que la globulina modificada se obtiene en la concentración final deseada de 16,5% y no precisa ser concentrada para envasado final.

EJEMPLO 9.

Los niveles de suero sanguíneo de gamma-globulina de pacientes agammaglobulinémicos son aumentados a al menos los niveles logrados por la administración intramuscular de 10 ml de una solución al 16,5% de ISG no modificada, por la administración I.V. de 16,5 ml de una solución al 10% de la ISG modificada de los Ejemplos 5 ó 6 en glicina 0,3 M estéril, 0,45 % de NaCl. Los tiempos de semi-vida son sustancialmente los mismos.

EJEMPLO 10.

3-3-73

412551



La administración I.V. de 1 ml de una solución al 16,5% de ISG hiperinmune (250 unidades de anticuerpos de tétano por ml de una solución al 16,5%), modificada de acuerdo con el Ejemplo 6, en glicina 0,3
5 M, 0,45% de NaCl, logra al menos el mismo efecto inmunológico que la administración I.M. de una dosis igual de la ISG hiperinmune de partida ("Hyper-Tet[®]", Cutter Laboratories, Inc., Berkeley, Cal.)

Los ejemplos precedentes pueden ser repetidos con éxito similar sustituyendo los reaccionantes y/o las condiciones de trabajo de este invento que se describen genérica o específicamente por las utilizadas en los ejemplos precedentes.

La presente solicitud, que corresponde a
15 la presentada en los Estados Unidos de América, el 13 de Marzo de 1.972, bajo el N° 234.006, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

25

11-3-73

412551



- REIVINDICACIONES -

5

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

15

20

25

1ª.- Un procedimiento para la producción de una seroglobulina inmune modificada administrable por vía intravenosa que tiene sustancialmente todos los enlaces disulfuro intercadenas uniendo cadenas pesadas y cadenas ligeras y hasta un total de aproximadamente 4 enlaces disulfuro reemplazados por pares de grupos $-S-CH_2CONH_2$, permaneciendo las cadenas ligeras unidas con las cadenas pesadas por asociación no covalente, de manera que el peso molecular aparente en disolventes no disociadores es sustancialmente el mismo que el de la seroglobulina inmune no modificada, estando dicha seroglobulina inmune modificada sustancialmente libre de actividad anticomplemento tanto real como latente y teniendo sustancialmente la semi-vida bioló-

4-3-74

- 54 -

412551



gica y la actividad anticuerpos de seroglobulina in-
mune no modificada, que comprende las etapas de: (a)
reducir a un pH débilmente alcalino desde 2 a aproxi-
madamente 4 enlaces disulfuro de una solución acuosa
5 de seroglobulina inmune no modificada con ditiotrei-
tol en una concentración en la mezcla de reacción de
menos de aproximadamente 0,01 M y en una proporción
molar con respecto a la proteína de aproximadamente
2,5 a 50; (b) alcohilar a un pH débilmente alcalino
10 una solución acuosa de la seroglobulina inmune así
reducida con al menos un equivalente molar, calcula-
do con respecto al ditiotreitól, de yodoacetamida;
y (c) separar la seroglobulina inmune modificada re-
sultante de los productos de reacción no proteínicos
15 y de los reaccionantes.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la
reivindicación 1ª, en que la etapa de reducción se
lleva a cabo con una concentración de proteína de al
menos aproximadamente 1%.

20 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la rei-
vindicación 1ª, en que la etapa de reducción se lle-
va a cabo con una proporción molar de ditiotreitól a
proteína de aproximadamente 4-6.

25 4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la rei-
vindicación 1ª, en que en la etapa de reducción se pro

MM

412551



duce un promedio de 4 a 8 grupos SH por molécula.

5^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en que la etapa de reducción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8,0 a 8,6.

5
10
6^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2^a, en que la etapa de reducción se lleva a cabo con una proporción molar de ditiotreitól a proteína de aproximadamente 5 y a un pH de aproximadamente 8,0 a 8,6 y se produce un promedio de aproximadamente 5,5 a 8,2 grupos SH por molécula.

15
7^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en que la etapa de alcoholación se lleva a cabo con un exceso de al menos aproximadamente 10% de equivalentes molares de yodoacetamida, calculado con respecto al ditiotreitól.

8^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en que la etapa de alcoholación se lleva a cabo con un pH de aproximadamente 7,2 a 9,0.

20
9^a.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6^a, en que la etapa de alcoholación se lleva a cabo con un exceso de al menos aproximadamente 10% de equivalentes molares de yodoacetamida, calculado con respecto al ditiotreitól, y a un pH de aproximadamente 8,0 a 8,6.

25
10^a.- Un procedimiento de acuerdo con la

MM

412551



reivindicación 1ª, en que en la etapa de separación la seroglobulina inmune modificada es precipitada con disolvente.

5 11ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en que en la etapa de separación los productos de reacción no proteínicos y los reaccionantes son eliminados por diálisis.

10 12ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en que la seroglobulina inmune mo modificada es separada en forma de una solución, que luego es concentrada a una concentración más elevada.

15 13ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12ª, en que la solución de la seroglobulina inmune modificada separada es concentrada por ultrafiltración.

14ª.- Un procedimiento para la producción de una seroglobulina.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

4-3-74

- 57 -

412551



Esta Memoria consta de cincuenta y ocho
hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 8 MAR. 1974

P.A. Alberto de Elizaguru
Per Fedch

5

4-3-74
juj

- 58 -

412551

412551

12

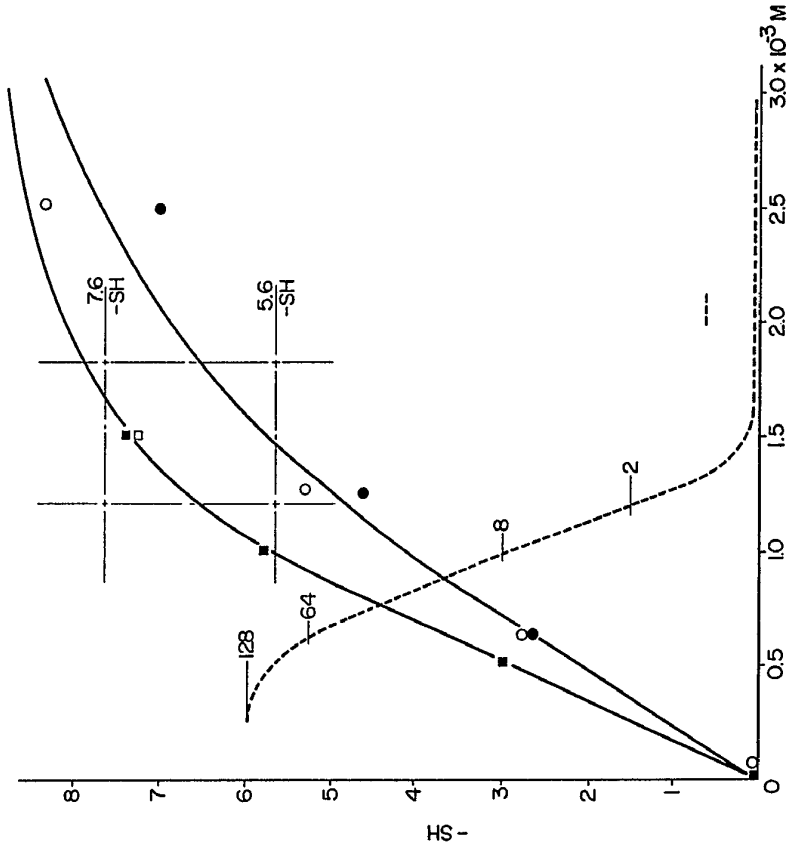
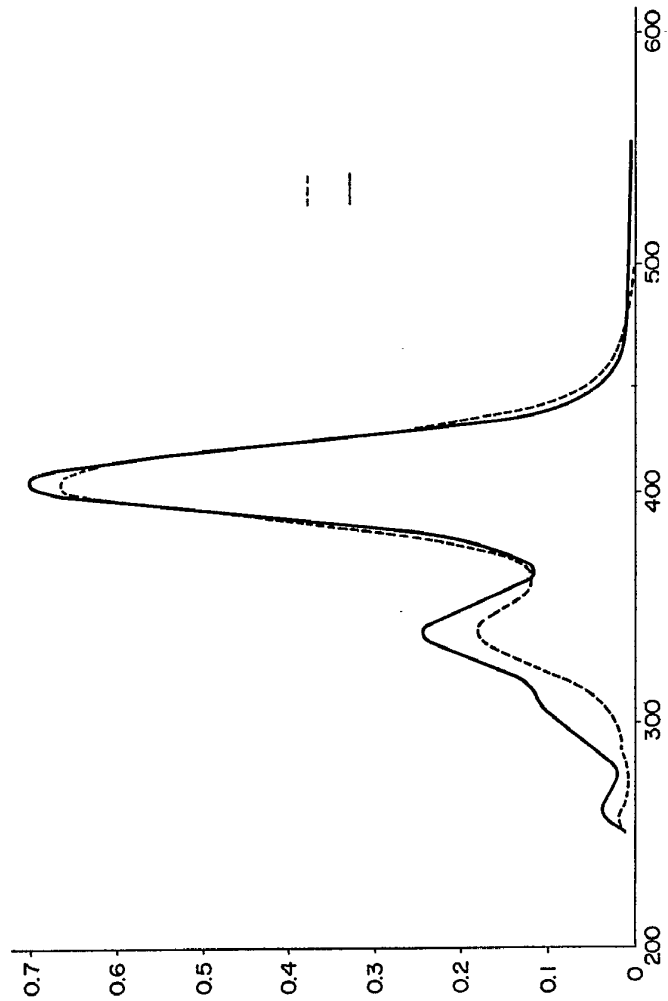


FIG. 1

FIG. 2



ALBERT S. LINDHART
Signature

412551

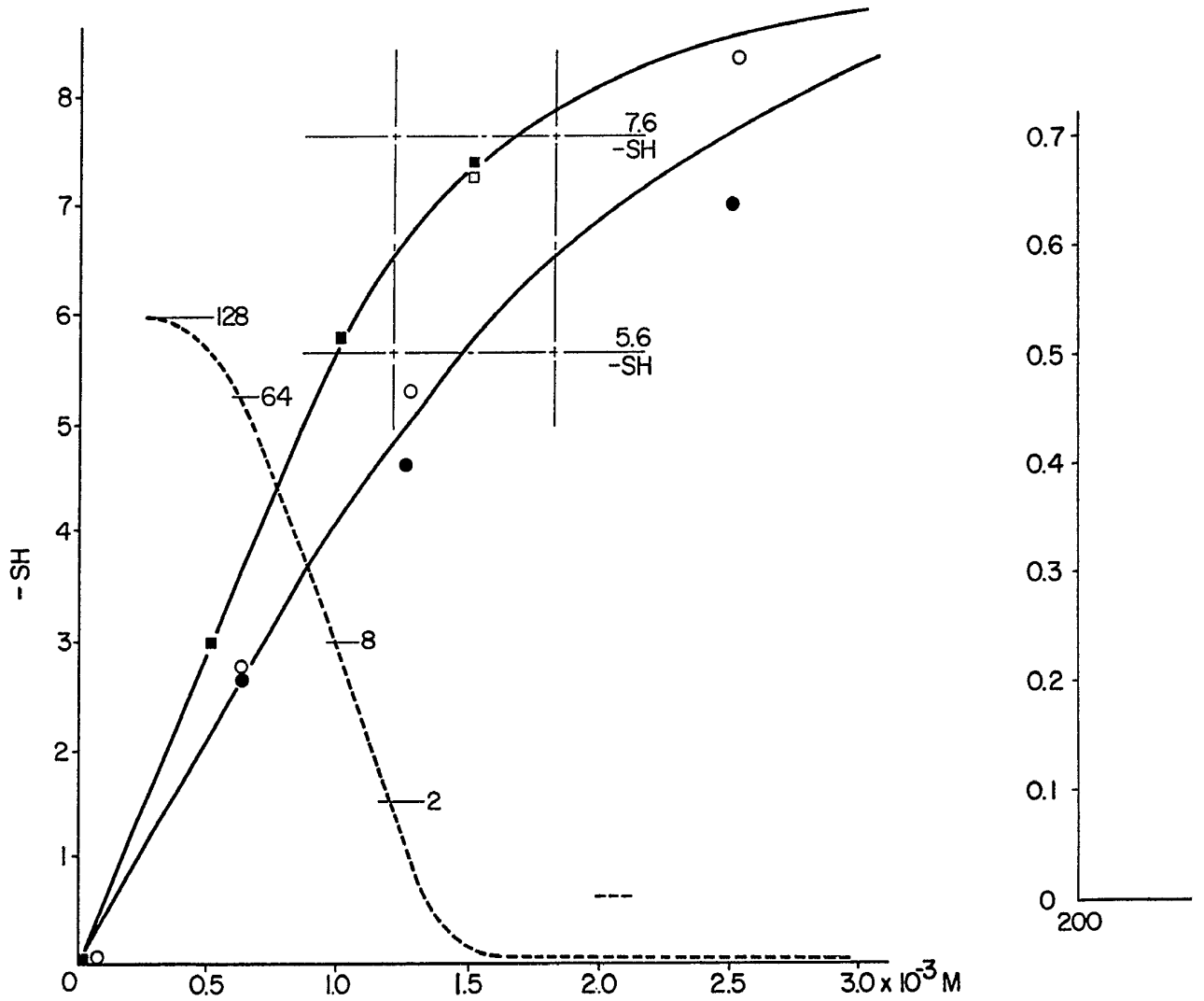


FIG. 1

412551

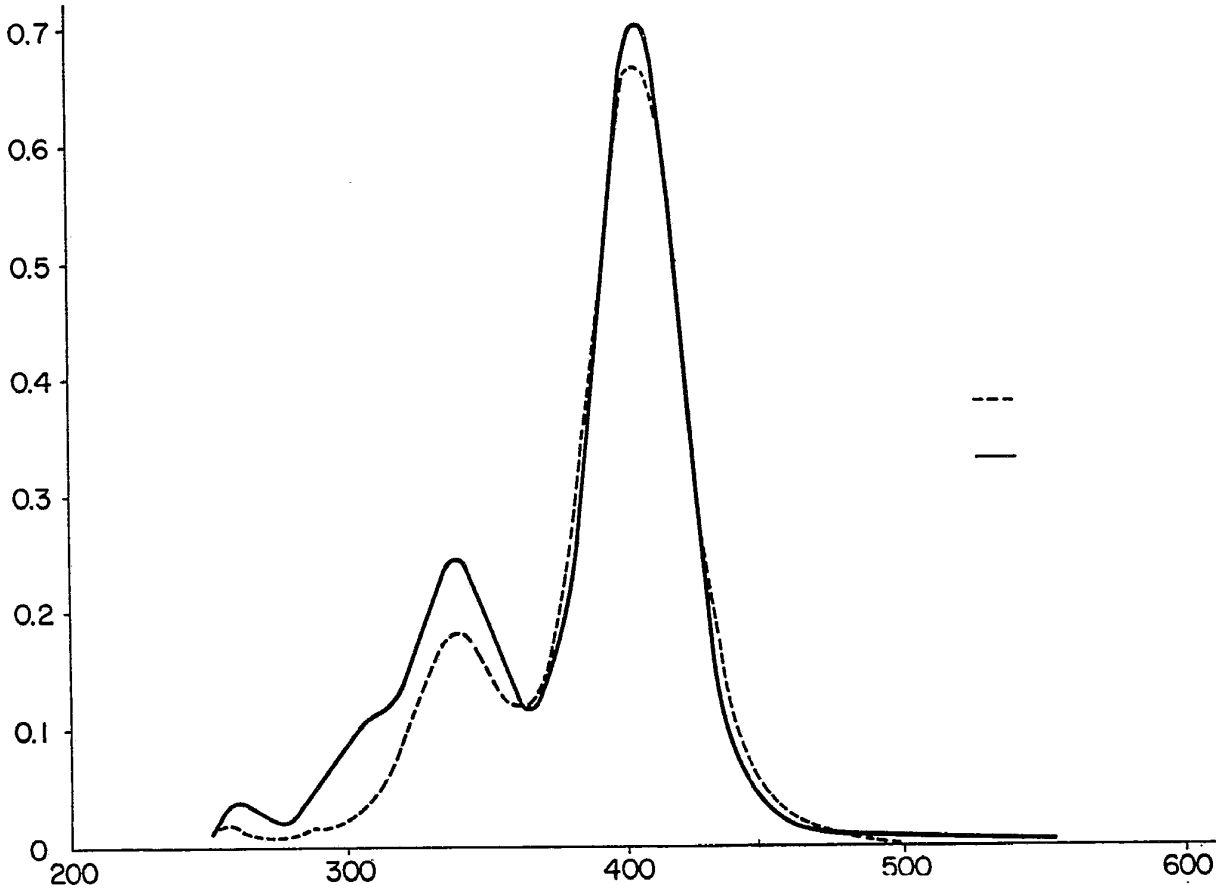
P-53697

412551

12/1/73



FIG. 2



Alberto de Vissani
12/1/73