

Int. Cl. C 12/14

439513

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

INSTITUT FRANCAIS D'IMMUNOLOGIE

sociedad anónima francesa, domiciliada en
256, rue Marcel Néricux, F-69-Lyon-7,
Francia, relativa a:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE SUERO AN
TILIMFOCITARIO HUMANO"

=====

Inventor: Marc Bonneau

Prioridad: Solicitud de patente en Francia nº
74.25176 de fecha 19 julio 1974.

BAD ORIGINAL

RESUMEN DESCRIPTIVO

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un suero antilinfocitario humano. Se sabe que los sueros antilinfocitarios humanos son sueros heterólogos, es decir obtenidos por la administración de una preparación de antígenos linfocitarios humanos a un animal, generalmente un equino, del cual se recoge a continuación el suero. - - - - -

Se sabe también que los sueros así obtenidos presentan inconvenientes serios para el organismo humano tratado, siendo estos inconvenientes debidos esencialmente a la naturaleza heteróloga del suero que presenta, por una parte, un gran número de actividades antitumorales, y contiene, por otra parte, diferentes constituyentes tóxicos o susceptibles de efectos indeseables. - - - - -

Estos inconvenientes son tanto más sensibles dado que el suero antilinfocitario humano está generalmente destinado a ser administrado a unas dosis muy importantes. De ello resultan muy a menudo que los diversos efectos indeseables del suero impiden una utilización eficaz de sus propiedades inmuno-depresivas y antilinfocitarias. - - - - -

5. Se ha propuesto ya eliminar las propiedades anti-
globulos rojos del suero antilinfocitario colocando el suero
en presencia de hemáticos humanos, pero esta técnica es
extremadamente cara y no conduce más que a resultados muy
incompletos. - - - - -

10. La presente invención se propone proporcionar un
procedimiento de preparación del suero antilinfocitario hu-
mano que permita evitar todos estos inconvenientes y obte-
ner un suero antilinfocitario concentrado, altamente purifi-
cado, prácticamente desprovisto de actividades secundarias
o indeseables, y que permite por ello un tratamiento anti-
linfocitario eficaz a unas dosis intensas. - - - - -

15. La invención tiene por objeto un procedimiento de
preparación del suero antilinfocitario humano en el cual se
administran a un animal unos antígenos de linfocitos huma-
nos y se recoge el suero antilinfocito humano del animal,
caracterizado porque se efectúa una absorción de este suero,
recogido por paso sobre una preparación de tejido placentar-
io humano, a continuación de lo cual se recoge el suero
20. que ha sufrido este paso y, preferentemente, se concentra
seguidamente este suero. - - - - -

25. En un modo de realización preferido, se elimina
la albúmina y las beta-globulinas del suero antes del paso
sobre el tejido placentario, esta eliminación puede efec-
tuarse según los métodos habituales por ejemplo por fraccio-
namiento con Rivamol (lactato de 2-oxo-6,9-diaminocapridi-

na). - - - - -

5. De forma preferente, se efectúa, después del paso sobre el tejido placentario, una concentración, haciendo esta concentración de forma ventajosa ser efectuada por precipitación con etanol. - - - - -

10. Según un modo de realización ventajoso de la invención, se efectúa, después del paso sobre el tejido placentario, y preferentemente después de la concentración, una purificación con la ayuda de un agente de separación tal como por ejemplo el gel de alúmina. - - - - -

15. De acuerdo con un modo de realización particularmente preferido de la invención, el tejido placentario, antes de la absorción es triturado y después lavado varias veces, a continuación de lo cual se efectúa una fijación del tejido con la ayuda, por ejemplo, de soluciones de glutaral dehidro y/o de formal, siendo el tejido a continuación calentado a una temperatura comprendida entre 0°C y 37°C por una duración, por ejemplo del orden de 10 horas, suficiente para desactivar los eventuales contaminantes virales y bacterianos presentes en el tejido. - - - - -

20. De acuerdo con una característica importante de la invención, el número de pasos de absorción del suero sobre el tejido es de 1 a 5, siendo este número preferentemente de 3 ó 4. Cada paso se efectúa poniendo el suero en contacto con el tejido placentario por una duración comprendi-

da entre 30 mm y 2 horas, y preferentemente del orden de 1 hora, a una temperatura comprendida entre 4°C y 40°C y preferentemente del orden de 37°C, con preferencia bajo agitación moderada. Las cantidades respectivas de suero y de tejido puestas en presencia son determinadas en función de la concentración del suero a absorber, siendo estas cantidades preferentemente de aproximadamente 2 a 10 volúmenes de suero por un volumen de tejido prensado. - - - - -

5. Al fin del paso el suero es separado del tejido placentario por prensado de este tejido, siendo recogido el líquido de prensado. - - - - -

10. De acuerdo con la invención el pH, cuando tiene lugar el paso, está comprendido entre 6,5 y 7,5 siendo preferentemente del orden de $7 \pm 0,2$. - - - - -

15. La eliminación de las albúminas y beta-globulinas por el Rivanol, según el modo de realización preferido de la invención, puede ser ventajosamente efectuado adicionando al suero que proviene del animal una solución de Rivanol que comprende aproximadamente 12 a 15 g de Rivanol por litro de suero, siendo ajustado el pH entre 7 y 8 y preferentemente del orden de 7,7 bajo una agitación suave seguida de una decantación. El sobrenadante es seguidamente recogido y el exceso de Rivanol es eliminado. - - - - -

20. De manera ventajosa, la concentración con etanol, que está prevista según un modo preferido de la invención, 25.

5. se efectúa a una temperatura inferior a -5°C y un pH comprendido entre 6,5 y 7,5 y preferentemente del orden de $7 \pm 0,2$, por una duración de 8 horas a 16 horas, a continuación de lo cual el precipitado obtenido es separado, preferentemente por centrifugación y después puesto de nuevo en solución, siendo esta solución seguidamente dializada en agua. - - - - -

10. En una variante de la invención se puede también efectuar una etapa suplementaria de purificación por técnicas de cromatografía tales como pasos sobre resinas intercambiadoras de iones que permitan separar las gamma-globulinas IgG_2 de las gamma-globulinas IgG_1 . - - - - -

15. El tratamiento final de purificación, efectuado por ejemplo por tratamiento con gel de alúmina, puede realizarse adicionando gel de alúmina al suero concentrado, ajustando el pH a un valor comprendido en 6,5 y 7,5 y preferentemente del orden de $6,8 \pm 0,2$ y calentando moderadamente, a continuación de lo cual se efectúa una centrifugación, y se somete el sobrenadante a una o varias filtraciones estériles. - - - - -

20. Este tratamiento con gel de alúmina permite eliminar por una parte las trazas de contaminantes proteicos indeseables (hemoglobina, beta-globulinas) pero también los contaminantes pirógenos. - - - - -

25. El suero según la invención es destacable por sus

propiedades inmuno-depresivas y antilinfocitarias y es aplicable en el hombre en las afecciones y para los tratamientos que necesitan una inmuno-depresión, particularmente en el tratamiento de aceptación de injertos de órganos. - - -

5. El suero según la invención es particularmente destacable por las propiedades siguientes determinadas in vitro: - - - - -

- Ausencia de hemaglutinación en el test de COOMBS,

- Ausencia de actividad antiplaquetas, - - - - -

10. - Ausencia de actividad antifibrinolítica, - - -

- Especificidad incrementada con respecto a los otros sueros antilinfocitarios, detectable particularmente en la inhibición de cultivo mixto, - - - - -

- Débil porcentaje de proteínas, - - - - -

15. El suero es también destacable por las propiedades siguientes determinadas in vivo: - - - - -

- Alargamiento de supervivencia de los aloinjertos cutáneos en el mono para una dosis mucho más pequeña y por una duración mucho más importante, - - - - -

20. - Tolerancia netamente incrementada con respecto a los sueros antilinfocitarios existentes, a causa de una toxicidad netamente más reducida que permite aumentar varias

veces la dosis administrada. - - - - -

- Actividad comparativa incrementada en razón de la eliminación de la concurrencia antigénica gracias a la eliminación de los anticuerpos antiespécie. - - - - -

5. El suero según la invención es preferentemente ajustado, si es necesario, a una actividad del orden de 650 unidades linfocitotónicas por mililitro, efectuándose esta titulación, por ejemplo, según la técnica MICKELFIT. - - -

10. Las dosis administradas para el tratamiento por vía intravenosa o intramuscular pueden estar comprendidas entre 200 y 1.000 mgr por día. - - - - -

Otras ventajas y características de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente dada a título de ejemplo no limitativo. - - - - -

15. A. Preparación del suero bruto :

20. El suero se obtiene administrando a un caballo una preparación de antígenos linfocitarios (linfocitos enteros que provienen de derivación de canal torácico o de esféres tónicas, o las sufracciones celulares correspondientes) según un esquema repetitivo semanal y recogiendo el plasma del caballo en una duración de 45 días a 6 meses, después del principio de inmunización, por plasmaféresis. -

Este plasma puede ser ventajosamente almacenado a

-20°C esperando las operaciones ulteriores. - - - - -

B. Preparación del tejido placentario fijado :

5. El tejido placentario puede ventajosamente estar constituido por tejido placentario humano que haya sufrido una secuencia de operaciones de extracción de las gomas-globulinas placentarias por unos métodos conocidos tales como el método de Cohn. - - - - -

Es así posible utilizar un tejido humano normalmente desechado. - - - - -

10. El tejido placentario es en principio triturado y después lavado con agua destilada a temperatura relativamente baja. El tejido es a continuación escurrido por prensado para eliminación de la solución de lavado. Preferentemente las operaciones de lavado y de prensado son repetidas varias veces seguidas, por ejemplo dos veces. - - - - -

15. Después del último lavado, el tejido escurrido es tomado de nuevo en agua salada en cantidad, preferentemente, aproximadamente igual, por ejemplo del orden de 1 litro de agua salada a 9°/oo para un kg de tejido. - - - - -

20. El tejido tomado de nuevo en agua salada es a continuación mezclado a una solución fijadora de glutaraldehído, agitado y después prensado. Una solución de este tipo de glutaraldehído pueda ser por ejemplo obtenida mezclando

40 ml de solución de glutaraldehído al 50% en agua con 20 l de agua salada al 9^o/oo, pudiendo la mezcla realizarse mezclando 20 l de esta solución fijadora con 10 kg de tejido contenido en 10 l de agua salada. Después de que el tejido haya sido prensado para eliminar la solución de glutaraldehído de sobrenadante, el tejido húmedo de nuevo tomado en agua salada a razón, por ejemplo, de 1 kg por litro de agua salada. - - - - -

5. El tejido así tomado de nuevo es seguidamente mezclado a una solución fijadora de formal obtenida, por ejemplo, mezclando 100 ml de solución de formal al 30% con 20 l de agua salada al 9^o/oo. Se mezclan preferentemente 20 ml de solución de formal por 10 kg de tejido tomado en 10 l de agua salada. La mezcla se agita durante 1 hora y después se deja una noche en cámara fría a +4°C. - - - - -

10. Después de ello el tejido es prensado y después tomado de nuevo en tres veces su peso de agua salada. - - -

15. El tejido así tomado de nuevo es a continuación calentado durante una decena de horas a una temperatura del orden de 60°C bajo suave agitación de manera que se inactivan los antígenos susceptibles de ser peligrosos. - - - - -

20. Después del calentamiento, el tejido es prensado y después lavado varias veces, siendo el tejido fijado y prensado finalmente tomado de nuevo en una vez su peso de agua salada preferentemente al 9^o/oo. El tejido está caten-

25.

es preparado para asegurar la absorción del suero. - - - -

9. Eliminación de las albúminas y beta-globulinas:

5. El plasma que proviene del animal, liberado de los hematíes es mezclado a una solución de Rivanol, por ejemplo una solución de volumen tres veces igual al volumen del plasma y que contiene 4,5 g de Rivanol por litro. El pH es ajustado a 7,7. La mezcla es conservada varias horas a temperatura ambiente bajo agitación suave y durante este tiempo se verifica el pH y eventualmente se reajusta. Se deja a 10. continuación decantar la mezcla una noche a temperatura relativamente baja del orden de +4°C. - - - - -

15. Después de esta decantación se extrae el sobrenadante claro por aspiración y se centrifuga el resto del sobrenadante y el precipitado. El precipitado centrifugado es eliminado y el sobrenadante de centrifugación es adicionado al sobrenadante aspirado. - - - - -

20. El exceso de Rivanol es a continuación eliminado por adición de una cantidad suficiente de cloruro de sodio, a continuación de lo cual se deja de nuevo decantar la mezcla 48 horas a +4°C. - - - - -

Se extrae de nuevo el sobrenadante claro por aspiración y se filtra el resto del sobrenadante para eliminar el precipitado, siendo el filtrado mezclado al sobrenadante aspirado, y siendo ajustado el pH a 7 si es necesario. - -

2. Absorción sobre la placenta :

5. La absorción se efectúa resolando 1 litro de la preparación de plasma obtenida según C a aproximadamente 1/2 kg de la preparación de tejido placentario obtenido según D. El pH se ajusta a $7 \pm 0,2$ y el tejido se deja en contacto con el plasma por una duración del orden de 1 hora a 37°C , preferentemente bajo agitación moderada. - - - - -

La mezcla es seguidamente prensada y el líquido de prensado recogido. - - - - -

10. Después de esta primera absorción se verifica inmediatamente si la absorción ha sido suficiente o no con la ayuda de los tests de hemaglutininas, de hemolisinas y el test de COCCIS. - - - - -

15. Si estos tests permanecen positivos se efectúa entonces, por lo menos, un nuevo paso del líquido de prensado sobre una preparación de tejido fresco según D. El número de estos pasos de absorción es función de los resultados de control obtenidos después de cada absorción. Las absorciones se prosiguen hasta desaparición de las actividades hemaglizantes y hemaglutinantes directas e indirectas de los líquidos de prensado. - - - - -

20.

Cuando estas actividades han desaparecido, el líquido de prensado finalmente obtenido es preferentemente filtrado. - - - - -

E. Concentración del suero absorbido :

5. El líquido obtenido según D es enfriado a la proximidad de 0°C y, siempre a baja temperatura, se vierte lentamente en el líquido alcohol etílico enfriado entre -4°C y -10°C a razón de aproximadamente 4,25 l de alcohol de 95° por 10 l de líquido. La temperatura de la mezcla es preferentemente siempre mantenida inferior a 25°C durante la adición del alcohol. - - - - -

10. Durante esta adición de alcohol etílico, el pH se mantiene o es llevado a un valor que permita la precipitación con el alcohol, siendo este valor por ejemplo del orden de $7 \pm 0,2$. - - - - -

15. Después de una decantación en cámara fría, se efectúa una centrifugación en frío, por ejemplo a -30°C, para separar el precipitado del sobrenadante. El precipitado separado es entonces rápidamente tomado de nuevo en agua porcionada y helada a razón de aproximadamente 1 kg de precipitado por litro de agua helada. La disolución es facilitada por suave agitación y adición de un tampón, por ejemplo un tampón neótico, siendo llevado el pH a un valor comprendido preferentemente entre 5 y 6. - - - - -

20.

25. La solución obtenida es seguidamente colocada en mangas de dialisis, las cuales son colocadas en el agua ordinaria a baja temperatura por ejemplo +2°C durante aproximadamente 48 horas, siendo constantemente renovada el agua

de diálisis. Dicha diálisis es ajustada, si es necesario, para contener aproximadamente 80 g de proteínas por litro de solución. - - - - -

V. Purificación final :

5. A la solución obtenida según E se incorpora, bajo agitación, una cantidad de gel de alúmina concentrado pastoso cuyo peso es aproximadamente el doble del peso de proteínas contenidas en la solución. El pH es ajustado si es necesario a un valor del orden de $6,8 \pm 0,2$ y después la mezcla es calentada a baño maría durante algunas horas. - - - - -
- 10.

La preparación así obtenida es regularmente centrifugada a temperatura baja, por ejemplo a $+4^{\circ}\text{C}$, y el líquido sobrenadante es recogido, siendo reajustado su pH si es necesario. - - - - -

15. Se adiciona a continuación lentamente al sobrenadante cloruro de sodio cristalizado a razón de aproximadamente 1 g por litro y glicocola en polvo a razón de aproximadamente 20 g por litro. Si es necesario se reajusta el pH a aproximadamente $6,8 \pm 0,2$. - - - - -

20. Se efectúa a continuación una sucesión de filtraciones de esta mezcla, siendo efectuada la última filtración por lo menos en condiciones rigurosas de esterilidad. -

Se obtiene así una solución a granel del suero antitumefocitario según la invención. - - - - -

El control efectuado en este estado da normalmente los resultados siguientes: - - - - -

- Porcentaje de proteínas inferior o igual a 50 g/l
- Esterilidad satisfactoria - - - - -
- 5. - Pirógenos satisfactorios - - - - -
- Linfocitotoxicidad : superior o igual a 1/512
- Hemaglutininas : inferior o igual a 1/8 - - - -
- Hemolisina : inferior o igual a 1/8 - - - - -
- Test de COGLES inferior o igual a 1/8. - - - -

10. El procedimiento que comprende las etapas A.B.C. D.E.F. ha sido dado a título de ejemplo de realización preferida. Queda desde luego entendido que es posible aportar a la misma algunas variantes fácilmente comprensibles por el técnico. - - - - -

15. Así, en la etapa C, este fraccionamiento con Rivinol puede ser remplazado por otros métodos de eliminación de las albúminas y beta-globulinas, tales como por ejemplo una precipitación selectiva con alcohol o una absorción por sílice coloidal. - - - - -

20. La etapa B de preparación del tejido placentario puede ser modificada y en particular es posible remplazar el formal y el glutaraldehído por otras soluciones fijadoras, tales como por ejemplo el líquido de Bouin. - - - - -

La etapa de concentración 2 puede realizarse reemplazando la precipitación con alcohol por otros métodos de concentración, por ejemplo unos métodos cromatográficos. A título únicamente de ejemplo un método cromatográfico de este tipo puede ser utilizado de la forma siguiente: - - - -

Una resina intercambiadora de iones, por ejemplo del tipo D. E.-52 Whatman microgranular "pre-swollen", se equilibra con la ayuda de tampón fosfato 0,002 M a pH 6,8 a baja temperatura. A la suspensión de resina se adiciona la solución de ácido trifosfórico 0,002 M hasta obtención de un pH 6,8. La resina es seguidamente recuperada por centrifugación y a la resina centrifugada se adiciona de nuevo tampón fosfato 0,002 a pH 6,8; se efectúa una nueva centrifugación y esta operación es de nuevo repetida una vez. - -

Se adiciona finalmente la resina centrifugada y equilibrada tampón fosfato 0,002 M pH 6,8. - - - - -

La preparación de suero que proviene de D es además puesta en diálisis contra el tampón fosfato 0,002 M pH 6,8 y después el suero dializado es puesto en contacto con la resina equilibrada por una duración de aproximadamente 30 min a +4°C; se efectúa seguidamente una centrifugación y se recoge el sobrenadante que contiene las gomas-globulinas IgG₂. - - - - -

Se adiciona de nuevo tampón al residuo de resina, bajo agitación, después se efectúa una centrifugación de la

que se recoge el sobrenadante que se mezcla al sobrenadante precedente, obteniendo así la fracción de las $gamma_2$. - - -

5. El residuo de resina es seguidamente tomado de nuevo y se le adiciona un nuevo tampón fosfato 0,002 M pH 6,8 a +4°C bajo agitación, a continuación de lo cual se efectúa una centrifugación y se recoge el sobrenadante. El residuo de resina es tomado de nuevo con la ayuda del mismo tampón y una nueva centrifugación permite obtener un segundo sobrenadante que es mezclado al primero, constituyendo esta mezcla la fracción IgG_1 . - - - - -
10.

Las fracciones IgG_2 y IgG_1 son seguidamente filtradas estérilmente. - - - - -

N O T A

15. Se declara de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - -

REIVINDICACIONES

20. 1.- Procedimiento de preparación de suero antilinfocitario humano, en el cual se administran a un animal unos antígenos de linfocitos humanos y se recoge el suero antilinfocito humano del animal, caracterizado porque se efectúa una absorción de este suero recogido por paso sobre una preparación de tejido placentario humano, a continuación de lo cual se recoge el suero que ha sufrido este paso. - - -

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se efectúan de 1 a 5 pasos.

5. 3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque previamente se tritura y lava el tejido placentario y porque se efectúa una fijación de dicho tejido y un calentamiento de inactividad. -

10. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la fijación del tejido se efectúa con la ayuda de por lo menos un agente fijador tal como las soluciones de glutaraldehído o de formal o incluso con el líquido de Bouin. - - - - -

15. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque para un paso, el suero se pone en contacto con el tejido placentario durante una duración comprendida entre 30 minutos y 2 horas. - - -

6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la temperatura del suero está comprendida entre 4 y 40°C. - - - - -

20. 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque cuando tiene lugar el paso el pH está comprendido entre 6,5 y 7,5. - - - - -

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque antes del paso sobre el tejido placentario, se eliminan la albúmina y las beta-

-globulinas del suero. - - - - -

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha eliminación se efectúa por adición de Rivanol. - - - - -

5. 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque se adiciona una cantidad de aproximadamente 12 a 15 g de Rivanol por litro de suero. - - - - -

10. 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, caracterizado porque el pH es ajustado entre 7 y 8. - - - - -

12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque después del último paso sobre tejido placentario, se concentra el suero. - - -

15. 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque la concentración se efectúa por una precipitación con etanol. - - - - -

14.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque la concentración se efectúa por pasco sobre una resina intercambiadora de iones. - - - - -

20. 15.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la precipitación con etanol se efectúa a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5 a baja temperatura, siendo el precipitado a continuación puesto de nuevo en solución.

16.- Procedimiento según la reivindicación 15, es caracterizado porque después de la puesta de nuevo en solución, la solución es diluida en agua. - - - - -

5.

17.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se efectúa un tratamiento final de purificación por adición de gel de alúmina.

10.

18.- Procedimiento según la reivindicación 17, es caracterizado porque la adición del gel de alúmina se efectúa ajustando el pH a un valor comprendido entre 6,5 y 7,5 bajo calentamiento moderado. - - - - -

19.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE SUERO ANTI-LINFOCITARIO HUMANO". - - - - -

15.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de veinte hojas, foliosas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 17 JUL 1975

P. A. M. CURELL SUÑOL

