

- 1 SET. 1975

440.603

P.- 61.187

HOE 74/B 023

007G//A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INMUNOGLO  
BULINAS AMIDIFICADAS"

5 El invento concierne a inmunoglobulinas modificadas, a un procedimiento para su preparación, y a medicamentos que contienen inmunoglobulinas modificadas. Especialmente, el invento concierne a inmunoglobulinas modificadas químicamente, que pueden ser administradas por vía intravenosa.

10 Las inmunoglobulinas preparadas por fraccionamiento a partir de suero, especialmente a partir de suero humano, tienen la propiedad esencial de ser activas como anticuerpos contra antígenos extraños al cuerpo.

15 Los preparados de inmunoglobulinas sólo se muestran hasta ahora apropiados en lo esencial para la administración por vía intramuscular. En el caso de administración por vía intravenosa los receptores reaccionan de modo más o menos pronunciado con formas de presentación anafilactoides.

20 Se supone que estas reacciones secundarias se basan en la fijación del complemento del suero por la inmunoglobulina administrada. Por otro lado, se desea un preparado de inmunoglobulina intravenoso, ya que pasa a entrar en acción con mayor rapidez en el organismo.

25 Ya se ha intentado de muchas maneras modificar las inmunoglobulinas de manera tal que se conserve su actividad de anticuerpos, pero se disminuya el grado de fijación del complemento en un grado tal que las inmuno-

globulinas modificadas puedan ser empladas para una administración por vía intravenosa. Por ejemplo, moléculas de inmunoglobulina pueden ser modificadas por degradación enzimática en el sentido de que sean eliminados los lugares de fijación para el complemento, pero el resto de la molécula todavía permanezca capaz de fijar antígenos. Tal preparado es administrado por vía intravenosa con buen éxito.

También la reacción de inmunoglobulina con agentes alcoholantes y acilantes conduce a una inmunoglobulina apropiada para la administración por vía intravenosa. Asimismo puede lograrse la disminución de la fijación del complemento por parte de inmunoglobulinas mediante alcoholación en N y mediante bencilación.

Se conoce además un procedimiento según el cual se desdoblan parcialmente inmunoglobulinas por reducción de enlaces disulfuro intramoleculares, y a continuación se someten a alcoholación los grupos sulfhidrilo formados. En este procedimiento se conserva el tamaño original de la molécula.

Estos procedimientos se basan en lo esencial en la modificación de los grupos amino libres o de enlaces disulfuro de la molécula de inmunoglobulina.

Si bien estos procedimientos conducen a productos con propiedades bastante satisfactorias, quedan

problemas que deben ser resueltos de modo mejorado, especialmente debido a que son modificadas esencialmente las propiedades fisico-químicas de la molécula por los procedimientos descritos.

5                   Se ha encontrado ahora que inmunoglobulinas en las que están modificados algunos grupos carboxilo, hacen variar esencialmente su comportamiento de fijación frente al complemento, sin perder su actividad como anti-  
10                   cuerpos. Las inmunoglobulinas modificadas de este modo, que son capaces de fijar el complemento sólo en pequeño grado o de manera no detectable, son apropiadas como me-  
                    dicamentos para la administración por vía intravenosa.

                    Por consiguiente, son objeto del invento inmu-  
noglobulinas amidificadas y además un procedimiento para  
15                   la preparación de dichas inmunoglobulinas amidificadas, que están caracterizados porque se hacen reaccionar inmu-  
noglobulinas con un exceso sobre el equimolar de una mo-  
noamina primaria y de una carbodiimida, en solución acuo-  
sa desde débilmente ácida hasta neutra. Es conveniente  
20                   que la proporción molar de amina a inmunoglobulinas sea por lo menos de 50:1 y que la proporción molar de carbo-  
diimida a inmunoglobulinas sea por lo menos de 1:1.

                    Como material de partida para la reacción de  
acuerdo con el invento sirven fracciones de inmunoglobuli-  
25                   lina obtenidas a partir de sueros, plasmas u otros líqui-

dos corporales o extractos de órganos. Especialmente se emplean las fracciones enriquecidas en lo que se refiere a inmunoglobulina G. Un método ventajoso para su preparación es, por ejemplo, el método desarrollado por  
5 Levy und Sober referente a cromatografía sobre DEAE-celulosa. Evidentemente, también pueden ser amidificadas de acuerdo con el invento las inmunoglobulinas puras. En la práctica, no obstante, no desempeñan ningún papel importante por el momento las inmunoglobulinas puras al  
10 100% a causa del costoso procedimiento de purificación necesario para obtenerlas.

Se ha mostrado que la fijación del complemento por las inmunoglobulinas da lugar a valores especialmente bajos si la proporción de carbodiimida a inmunoglobulinas es de 5:1 hasta 20:1. Como aminas en el sentido  
15 del invento son apropiadas todas las monoaminas primarias, es decir compuestos de la fórmula general  $R-NH_2$ , en la que R significa un radical que de acuerdo con los conceptos conocidos en la inmunología no constituya ningún  
20 grupo o motivo antígeno señalado.

Ejemplos de aminas apropiadas son en primer término aminas alifáticas, metilamina, etilamina y aminas alifáticas superiores, especialmente las que tienen hasta 10 átomos de carbono. En las soluciones acuosas  
25 débilmente ácidas que pasan a utilizarse, las aminas se

presentan en general en forma de los correspondientes ca  
tiones de amonio. Se prefieren en el sentido del invento  
las aminas que llevan otros grupos funcionales, especial  
mente grupos hidrófilos, tales como hidroxilo o acetal. Ejem  
5 plos de dichas aminas son etanolamina, trishidroximetilami  
nometano o glucosamina, que influyen favorablemente so-  
bre la solubilidad del producto de la reacción en un me-  
dio acuoso fisiológicamente compatible.

Dado que el procedimiento se lleva a cabo en un  
10 sistema acuoso, en condiciones en las cuales no ser daña-  
da la actividad de anticuerpos de la inmunoglobulina, es  
conveniente realizar la reacción, de manera en sí conoci-  
da, en presencia de una carbodiimida en calidad de acti-  
vador. Como carbodiimida son apropiados en el presente  
15 caso todos los representantes de esta clase de compues-  
tos que son capaces de actuar activando en el caso de la  
formación de enlaces péptido. Ejemplos de tales carbodi-  
imidias son el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino  
propil)-carbodiimida (EDC) o el meto-para-toluenosulfo-  
20 nato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida  
(CMC). Igual que las aminas, también las carbodiimidias se  
presentarán en forma de sales en las soluciones acuosas  
débilmente ácidas que pasan a utilizarse. En general, las  
carbodiimidias son llevadas a emplearse en forma de sales  
25 sin ninguna dificultad, ya que en esta forma son más es-

tables y más fáciles de manipular. En principio, no obstante, pueden utilizarse también las carbodiimidas libres que luego, al disolverse en la solución acuosa, se convierten a la forma de sal.

5                   La experimentación de la fijación del complemento puede llevarse a cabo de acuerdo con A. Nowotny, Basic Exercises in Immunochemistry, página 160 y siguientes (1969).

10                   El procedimiento de acuerdo con el invento para la preparación de inmunoglobulinas amidificadas se pueden llevar a cabo también con inmunoglobulinas en las cuales los grupos disulfuro presentes han sido reducidos para formar grupos sulfhidrilo. Para los productos amidificados a continuación de la reducción resultan las mismas propiedades ventajosas.

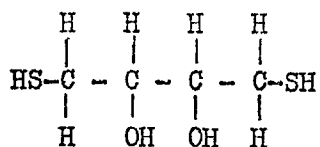
15

                  Para la reducción de enlaces disulfuro se pueden utilizar de modo especialmente ventajoso, por ejemplo, ditiotreitól o ditioceritrita. Los enlaces disulfuro, no obstante, también pueden ser reducidos, según un procedimiento conocido, con agentes reductores tales como 2-mercaptoetanol o mercaptoetilamina empleando elevadas concentraciones del agente reductor.

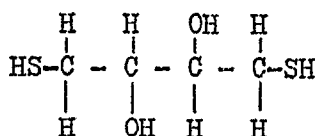
20

                  También los agentes reductores descritos por Cleland, con las siguientes fórmulas

25



5



10 pueden ser empleados para la reducción de las inmunoglobulinas.

15 Las inmunoglobulinas amidificadas con una suficiente disminución de la fijación del complemento pueden ser administradas por vía intravenosa. Pueden ser transformadas en preparados adecuados con disolventes fisiológicamente compatibles. Los medicamentos que contienen inmunoglobulinas amidificadas pueden ser puestos a disposición en forma líquida o secada por congelación.

El invento se va a explicar con mayor detalle ayudándose de los ejemplos seguidamente especificados.

20 Ejemplo 1

Preparación del material de partida.

25 22,1 litros de suero humano, obtenido a partir de sangre coagulada espontáneamente, son llevados a la transsalificación a través de una columna equilibrada a pH 6,3 con fosfato de sodio 0,0175 M, llena con

Sephadex G-25<sup>®</sup> "medium" (marca comercial registrada de la firma Pharmacia para dextrano reticulado). Con un fotómetro de circulación se mide en el eluato de la columna la absorción a 280 nm. El primer pico, formado por las proteínas del suero, es recogido por separado de las porciones de bajo peso molecular que le siguen, y es conducido a través de una columna a base de 15 kg de DEAE-celulosa con una capacidad intercambiadora de 1 mili equivalente/gramo, rociada con el tampón de fosfato arriba mencionado. La columna es rociada posteriormente con 1,5 volúmenes de columna de tampón. Las inmunoglobulinas que se encuentran en la porción que circula por la columna son precipitadas por adición de sulfato de amonio sólido hasta una concentración de 2,2 M. La mayor parte del líquido sobrenadante es retirada por sifonamiento después de reposar durante 24 horas, y el resto es eliminado mediante centrifugación a 5200 g (g = aceleración debida a la fuerza de la gravedad). El residuo de centrifugación es liberado de sulfato de amonio por diálisis frente a solución de NaCl 0,1 M. El volumen de la solución dializada de inmunoglobulina es completado a 2000 ml con solución de NaCl. Contiene en total 155 g de proteínas.

Amidificación de la inmunoglobulina.

1.000 ml de la solución de inmunoglobulina, obtenida de acuerdo con el modo de proceder arriba descri-

to, son dializados durante 24 horas con agitación frente a 1.000 ml de tampón 1 M de tris-hidroximetil-aminometano-("tris")-HCl de pH 5,4, son transferidos a un recipiente de vidrio, y son mezclados, agitando, con  
5 0,96 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.HCl. La carga es agitada a la temperatura ambiente durante dos horas.

La inmunoglobulina amidificada con tris-hidroximetil-aminometano es conducida después de ello a  
10 través de una columna que contiene 8 litros de Sephadex G-25<sup>R</sup>, que previamente ha sido rociada con una solución que tenía NaCl 0,15 M y glicina 0,3 M así como un valor de pH de 7,3. La densidad óptica del eluato de la  
15 columna es medida a 280 nm con un fotómetro de circulación. La porción del eluato que contiene la inmunoglobulina amidificada es reunida y concentrada con un ultrafiltro hasta llegar a un contenido de proteínas de 5%.

La siguiente tabla muestra una comparación de inmunoglobulina de partida con inmunoglobulina amidificada en lo que se refiere a la fijación del complemento  
20 y a la actividad de anticuerpos.

Tabla 1

	Fijación del com- plemento 1)	<u>Especificidad para anticuerpos</u>			
		Sarampión índice	Difteria UI/ml	Tétanos UI/ml	
Inmunoglobu- lina de par- tida	22%	1:1024	>0,5 <1,0	>1	<2
Inmunoglobu- lina amidifi- cada	0%	1:1024	>0,5 <1,0	>1	<2

- 1) La evaluación de la fijación del complemento se efectuó de acuerdo con NOWOTNY, A, Basic Exercises in Immunochemistry; Springer-Verlag, 1969, página 160.

5 Ejemplo 2

1.000 ml de solución de inmunoglobulina, obtenida de acuerdo con el ejemplo 1, con 75,5 g de proteínas, son mezclados con 890 ml de una solución que contiene 52,5 g de glucosamina.HCl, y el vapor de pH es  
10 ajustado a 6,0 con NaOH2M. Con agitación, se añaden a la solución 2,06 g de meto-para-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-carbodiimida, y la carga continúa siendo agitada durante 1 hora más. La  
15 temperatura de reacción es de 25°C. La transformación de la inmunoglobulina amidificada en una solución que

contiene NaCl 0,15 M y glicina 0,3 M, de pH 7,3, se efectúa de acuerdo con el modo descrito en el ejemplo 1, pero con una columna que contiene 10 litros de Sephadex G-25<sup>®</sup>. También la operación de concentrar hasta 5% de proteínas se efectúa como en el Ejemplo 1. Los resultados de la evaluación de la inmunoglobulina amidificada obtenida según el Ejemplo 2 están comparados con los de la inmunoglobulina de partida en la Tabla 2.

Tabla 2

Especificidad para anticuerpos

	Fijación del complemento 1)	Sarampión índice	Difteria UI/ml	Tétanos UI/ml
Inmunoglobulina de partida	22%	1:1024	>0,5 <1,0	>1 <2
Inmunoglobulina amidificada	1,5%	1:1024	>0,5 <1,0	>1 <2

Ejemplo 3

Reducción y amidificación de las inmunoglobulinas.

La amidificación de las inmunoglobulinas, des-

crita en los ejemplos 1 y 2, puede llevarse a cabo de igual modo con inmunoglobulinas reducidas. La reducción se lleva a cabo del siguiente modo:

Una solución de 3,3 g de inmunoglobulina en 330 ml de solución 0,15 M de NaCl es ajustada a pH 8,2 con tris(hidroximetil)-aminometano ("tris"). A la solución de inmunoglobulina se añaden 15,3 mg de ditioeritrita (DTE) disueltos en 2 ml de agua. Después de 60 minutos se añaden con agitación a la solución de inmunoglobulina 20 ml de una solución de "tris"-HCl de pH 1,0 que contiene 5 g de "tris". El valor del pH de la mezcla es ajustado a 5,0 con HCl y ésta es amidificada tal como se describe en el ejemplo 1 tras añadir 82,2 mg de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. HCl.

La reducción de las inmunoglobulinas se puede llevar a cabo en las mismas condiciones de ensayo con ditiotréitol (DTT) en lugar de con ditioeritrita.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el día 6 de Septiembre de 1974, bajo el Nº P 24 42 655.9, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

28.8.75

## 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 1ª.- Procedimiento para la preparación de inmunoglobulinas amidificadas, caracterizado porque se hacen reaccionar inmunoglobulinas con un exceso sobre la cantidad equimolar de una monoamina primaria y de una carbodiimida o una de sus sales, en solución acuosa desde débilmente ácida hasta neutra, después de lo cual la inmunoglobulina amidificada, eventualmente disuelta en  
15 un disolvente fisiológicamente tolerable, es transformada en una preparación administrable por vía intravenosa.

20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la proporción molar de amina a inmunoglobulinas es por lo menos de 50:1 y la proporción molar de carbodiimida a inmunoglobulinas es por lo menos de 1:1.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque la proporción molar de carbodiimida a inmunoglobulinas es de 5:1 hasta 20:1.

25 4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones

1ª a 3ª, caracterizado porque en calidad de amina se utiliza una monoamina alifática con 1 a 10 átomos de carbono por molécula, que en calidad de otros grupos funcionales pueden llevar hidroxilos y/o acetales.

5 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque en calidad de amina se utilizan etanolamina, trishidroximetilaminometano o glucosamina.

10 6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque en calidad de carbodiimida se utilizan clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida o meto-para-toluenosulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida.

15 7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque la reacción se efectúa con un valor de pH de 3 a 7.

20 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque la reacción se efectúa a una temperatura de 5 a 50°C.

9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 8ª, caracterizado porque se utilizan inmunoglobulinas humanas.

25 10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 9ª, caracterizado porque se utilizan inmuno-

globulinas en las cuales por lo menos un enlace disulfuro ha sido transformado en dos grupos sulfhidrilo mediante un agente reductor.

5 11ª.- Procedimiento según la reivindicación 10ª, caracterizado porque la transformación del enlace disulfuro en enlaces sulfhidrilo con un agente reductor se lleva a cabo a un valor de pH débilmente alcalino.

10 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 10ª, caracterizado porque la transformación del enlace disulfuro en enlaces sulfhidrilo con un agente reductor se lleva a cabo a un valor de pH débilmente alcalino con una concentración del agente reductor de 0,01 moles/litro y con una proporción molar de proteínas a agente reductor de 2,5-50:1.

15 13ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 10ª y 12ª, caracterizado porque en calidad de agente reductor se utilizan ditioeritrita o ditiotreitol.

14ª.- Procedimiento para la preparación de inmunoglobulinas amidificadas.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 21. MAY 1976

P.A.

Fernando de Elzaburu  
Por Poder

