



Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

(10) ES	(11) NUMERO	(12) A1
	474.697	
	(22) FECHA DE PRESENTACION	
	31-10-1978	

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
4859/77	1-11-1977	Dinamarca

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	

(24) TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR INTERFERON DE LEUCOCITOS PORCINOS, EXOGENO"

(71) SOLICITANTE (S)

ESS-FOOD THE DANISH BACON FACTORIES' EXPORT ASSOCIATION
(8210 55)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Axelborg, Axeltorv 3, DK-1609 Copenhagen V, Dinamarca

(72) INVENTOR (ES)

Kurt Bækgaard Osther y Werner Klinth Jensen

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ
(P.-70.323)

jga

1 La presente invención se refiere a una clase particular de interferones y a un procedimiento para la preparación de los mismos.

5 Los interferones son proteínas que son producidas por ciertas células vivientes, cuando las células son inducidas con diversos tipos de virus y con ciertas sustancias sintéticas. Los interferones son liberados desde las células y protegen a otras células contra las infecciones víricas (Glasgow, L.A., Interferon: A. Review., J. Pediat. 10 67: 104, 1965; Ho, M., Interferons. New Engl. J. Med., 266: 1258 - 1264, 1313 - 1318 y 1367 - 1371, 1962; Merigan, T.C., Winget, C.A. y Dixon, C.B., Purification and Characterization of Vertebrate Interferons; J. Molec. Biol., 13: 679 - 686, 1965; Wagner, R.R., Interferon. A. Review and Analysis of Recent Observations. Americ. J. Med., 38: 726 - 737, 15 1965).

20 Se ha demostrado que los interferones pueden ser inducidos en diversas células animales, incluidos los leucocitos. Los leucocitos humanos son considerados como buenos productores de interferón. Estas células pueden ser utilizadas para la preparación de interferón exógeno (Cantell, K., Hirvonen, S., Mogensen, K.E. y Pyhälä, L., Human Leukocyte Interferon: Production, Purification, Stability and Animal Experiments., Proceedings of a Tissue Culture 25 Association Workshop, May 1973, 35 - 38), pero los leucocitos humanos solamente pueden adquirirse en limitadas cantidades (de donadores de sangre). La función antivírica y, por lo tanto, protectora de las células, de los interferones, no es particularmente específica de especies. Por ejemplo, el interferón de leucocitos humanos protege, in vitro, 30

1 a las células cultivadas procedentes de diversos animales
no primates, tales como vacas, cerdos, etc. (Gresser, I.
Bandu, M.T., Brouty-Boyé, D. y Tovey, M.G., Pronounced
5 Antiviral Activity of Human Interferon on Bovine and Porci-
ne Cells., Nature, London, 251: 543 - 545, 1974). La pro-
ducción de interferón mediante fibroblastos cutáneos de
bovinos y células renales de porcinos, sólo podría mostrar
actividad de interferón sobre las células humanas, hasta
un pequeño grado o no mostrarla en absoluto. En contraste
10 con el interferón de leucocitos humanos, el interferón de
fibroblastos humanos mostraba un menor efecto antivírico
sobre las células cultivadas de bovino y de porcino. In vi-
tro, el interferón bovino tiene un efecto antivírico sobre
las células humanas (Tovey, M.G., Bandu, M.T., Begon-Lours,
15 J., Brouty-Boyé, D. y Gresser, I., Antiviral Activity of
Bovine Interferons on Primate Cells., J. Gen. Virol., 36:
341 - 344, 1977).

El interés clínico del interferón es también de-
bido al hecho de que, además de las posibilidades de tratar
20 enfermedades víricas, el interferón ofrece un amplio espec-
tro de posibilidades de tratamiento de enfermedades cance-
rosas (Cantell, K., Prospects for the Clinical Use of Exo-
genous Interferon., Medical Biology, 55: 69 - 73, 1977,
Strander, J., Cantell, K., Ingimarsson, S. and Jakobsson,
25 P.Å., Interferon Treatment of Osteogenic Sarcoma: A Clini-
cal Trial, Fogarty Int. Center Proc. Wash. D.C., 28: 377 -
381, 1977). El hecho de que hasta ahora solamente se hayan
efectuado relativamente pocos tratamientos, es debido a la
limitada producción de interferón de leucocitos humanos,
30 estando impuesta esta limitación por el número de donadores

1 de sangre.

Para la preparación de interferón en mayor escala, diversos especialistas han empezado a utilizar células linfoblastoides (por ejemplo, líneas de células Namalva),
5 que se caracterizan por su capacidad para dividirse por sí mismas de modo continuo y para producir interferón, y que son de origen maligno (Strander, H., Mogensen, K.E. y Cantell, K., Production of Human Lymphoblastoid Interferon., J. Clin. Microbiol., 1: 116 - 117, 1975).

10 Además, se ha intentado producir interferón de fibroblastos, induciendo a los fibroblastos humanos cultivados, en varios pasajes (Merigan, T.C., Discussion, In: Interferon, eds. G.E. W. Wolstenholme and M. O'Connor (J. & A. Churchill, London, 1968, p. 70). La desventaja de este tipo de producción es, en parte, que los fibroblastos
15 sólo son capaces de desarrollarse en un cultivo de capa única y no en los cultivos en suspensión, resultando así un rendimiento relativamente pequeño y, en parte, el que los fibroblastos solamente pueden ser empleados mediante relativamente pocos pasajes.

20 De acuerdo con la presente invención, se pueden preparar cantidades suficientes de interferón, de un modo adecuado y económico, utilizando, como células productoras de interferón, leucocitos porcinos, es decir leucocitos
25 procedentes de cerdos. De acuerdo con la invención, se ha encontrado que los leucocitos porcinos producen interferón que muestra una actividad protectora antivírica sobre las células humanas, tanto sobre las líneas de células primarias, como sobre las líneas de células continuas, y que las preparaciones de interferón purificado, preparadas a partir de
30

1 Los leucocitos porcinos, son toleradas por los seres huma-
nos por administración parenteral, incluso después de la
administración de una dosis iniciadora. Esto indica que el
interferón de leucocitos porcinos será utilizable como un
5 valioso sustituto del interferón humano, para los varios
usos en los que se ha encontrado que está indicado el in-
terferón humano (compárense, por ejemplo, las referencias
citadas arriba), incluido el tratamiento de enfermedades
tales como enfermedades víricas y enfermedades cancerosas
10 en seres humanos, para la profilaxis, junto con cualquier
forma de tratamiento supresor de la inmunidad, por ejemplo
también en este tratamiento, cuando se utiliza en relación
con un trasplante, etc., y que este sustituto puede ser
asequible en cantidades muy considerables. Además, el in-
15 terferón de leucocitos porcinos está indicado, desde luego,
para el tratamiento de enfermedades víricas en los cerdos
y en otros animales no primates y, en los seres humanos,
en los cerdos y en otros animales no primates, para el tra-
tamiento de enfermedades inducidas por microbios intrace-
20 lulares, tales como las Rickettsias.

Además, el interferón de leucocitos porcinos pue-
de ser utilizable para diversas finalidades, in vitro o co-
mo reactivo, por ejemplo, para investigaciones científicas
y como interferón de cebado para la preparación de interfe-
25 rón.

En la bibliografía se ha descrito el hecho de
que los leucocitos porcinos y otras células de los cerdos,
son capaces de producir interferón, compárense por ejemplo,
Toneva, V., Study on the Production and Qualities of Inter-
30 ferons Obtained from Porcine White Blood Cells Using Various

1 Viruses as Inductors, Proceed. of 3rd Int. Pig Veterinary
Society Congress, Lyon, June 12-14, 1974. Vengris, V.E. &
Maré, G.J., Swine Interferon I. Induction in Porcine Cell
Cultures with Viral and Synthetic Inducers, Can. J. comp.
5 Med., 36: 282-287, 1972, Richmond, J.Y. An Interferon-Like
Inhibitor of Foot-and-Mouth Disease Virus Induced by Phyto-
hemagglutinin in Swine Leukocyte Cultures. Arch. ges. Vi-
rusforsch., 27: 282 - 289, 1969, Richmond, J.Y., Interferon
of Foot-and-Mouth-Disease Virus: A New Assay for Interferon.
10 Arch. ges. Virusforsch., 30: 75 - 81, 1970). Estas referen-
cias tratan del efecto inhibidor (antivírico) del interfe-
rón, sobre enfermedades víricas que atacan a las células
animales, y en estas referencias, se utilizan varios tipos
de virus y varios tipos de inductores sintéticos, para la
15 inducción de interferón en los cultivos de leucocitos por-
cinos. Sin embargo, ninguna de estas referencias describe
el hecho de que el interferón de leucocitos porcinos muestra
una actividad protectora antivírica sobre las células huma-
nas, ni describen la preparación de un interferón de leuco-
20 citos porcinos que pudiera ser utilizada apropiadamente en
seres humanos.

Con el fin de que el interferón de leucocitos por-
cinos pueda ser apropiadamente utilizado en los seres huma-
nos, éste no debe dar lugar a reacciones de hipersensibili-
25 dad por administración parenteral a los seres humanos y,
de acuerdo con la presente invención, esto se obtiene, por-
que tanto durante la preparación de los leucocitos porci-
nos para la producción de interferón, como durante el mis-
mo procedimiento de producción del interferón, se evita
30 cualquier adición de proteínas que pueda dar lugar a reac-

1 - ciones de hipersensibilidad en los seres humanos, lo cual
se resuelve en la práctica, de acuerdo con la invención,
utilizando como fuentes de proteínas para los medios em-
5 pleados, fuentes de proteínas que están, en inmunoelectro-
foresis, sustancialmente exentas de bandas que no sean
idénticas o parcialmente idénticas a las bandas del suero
humano agamma, cuando se utiliza proteína de suero humano
antitotal, IgG antihumano, IgA antihumano, IgM antihumano
y albúmina antihumana, como anticuerpo precipitante (la
10 expresión "suero agamma" pretende designar al suero que ha
sido desprovisto de la fracción de gammaglobulina, por
ejemplo, separándola por precipitación con sal). Este re-
querimiento de la fuente de proteínas es satisfecho por el
plasma agamma humano y (desde luego) por el suero agamma
15 humano y por sus fracciones, incluida la albúmina humana y
la hemoglobina humana procedente de eritrocitos hemolizados
(la hemoglobina no mostrará sustancialmente ninguna banda
contra los anticuerpos anteriores). Sin embargo, de acuer-
do con la invención, es de una especial importancia el que
20 el requerimiento anteriormente mencionado sea también sa-
tisfecho por los correspondientes materiales porcinos, in-
cluidos el plasma agamma o el suero agamma porcinos o las
fracciones de tal suero agamma, incluyendo especialmente
la albúmina porcina, y por la hemoglobina porcina proceden-
25 te de eritrocitos hemolizados. El hecho de que las fuentes
de proteínas porcinas muestren esta identidad con los ma-
teriales proteínicos humanos, se utiliza en un aspecto adi-
cional de la presente invención, que se describe con mayor
detalle a continuación. La medida de utilizar, como fuente
30 de proteínas añadida, solamente una fuente que muestre la

1 - identidad anterior con el suero agamma humano, está en con-
traste con la técnica conocida, en la cual se han utiliza-
do fuentes de proteínas de un carácter no tolerable para
los seres humanos, tales como suero de ternera fetal o sue-
5 ro porcino total, para la incubación de células de anima-
les no primates.

Aparte del hecho de que muestra las propiedades
generalmente establecidas para el interferón en la biblio-
grafía, incluido el que es estable frente al pH, no diali-
10 zable, sensible a la tripsina, no sedimentable, relativamen-
te estable al calor y que muestra una actividad antivírica
de amplio espectro; el interferón de leucocitos porcinos
preparada con utilización de las medidas anteriormente in-
dicadas, que son características de la presente invención,
15 puede caracterizarse porque muestra una actividad antiví-
rica protectora sobre las células humanas en cultivo y por-
que, en la inmunolectroforesis, está sustancialmente exen-
to de bandas que no sean idénticas o parcialmente idénti-
cas a las bandas del interferón de leucocitos humanos o
20 del suero humano, cuando se utilizan, como anticuerpos pre-
cipitantes, proteínas de suero humano antitotal, IgG anti-
humano, IgA antihumano, IgM antihumano y albúmina antihuma-
na e interferón de leucocitos antihumanos, producidos en
la oveja, empleando interferón de leucocitos humanos pre-
parado como se describe por K. E. Mogensen y Kari Cantell
25 (Pharmac. Ther. A., Vol. 1, páginas 369 - 381, 1977),
aparte de cualesquiera bandas originadas por el medio en
el que el inductor de interferón (cuando este es un material
biológico) ha sido propagado. En otras palabras, esto sig-
nifica que en la inmunolectroforesis, el interferón de
30

1 leucocitos porcinos de acuerdo con la invención, muestra
una identidad con el interferón de leucocitos humanos pre-
parado de acuerdo con K. E. Mogensen y Kari Cantell
(Pharmac. Ther. A., volumen 1, páginas 369 - 381, 1977),
5 aparte de cualesquiera bandas originadas por el medio en
el cual ha sido propagado un inductor de interferón bioló-
gico. De aquí que tenga que haber una similitud tan gran-
de entre el interferón humano y el interferón porcino, que
las células humanas se muestren receptoras del interferón
10 porcino; compárense los valores indicados en el Ejemplo 4
de la concentración del interferón porcino determinada en
los cultivos de células humanas.

La gran similitud entre el interferón de leuco-
citos humanos y el interferón de leucocitos porcinos es
15 también evidente por los resultados de la electroforesis
de gradiente con gel de poliacrilamida, que muestra sustan-
cialmente bandas idénticas; véanse figuras 7 a 9 con la ex-
plicación concerniente.

Como se deduce del Ejemplo 5, parece que en lo
20 que respecta a su actividad protectora antivírica sobre las
células humanas en cultivo, el interferón porcino es par-
cialmente neutralizado por el interferón de leucocitos an-
tihumanos preparado en la oveja.

De acuerdo con la práctica común, el término "in-
25 terferón" en la presente memoria y reivindicaciones, pre-
tende designar no solamente la proporción de "moléculas de
interferón" en el producto, sino también las proteínas
acompañantes, las cuales no ha sido todavía posible elimi-
nar por completo con las actuales técnicas, y cuya comple-
30 ta eliminación puede no ser incluso ventajosa, especialmen-

1 te en lo que concierne a la parte de albúmina del producto.
Además del interferón crudo, el cual es en la práctica el
medio de cultivo o incubación en el cual se produce el in-
terferón en la preparación del interferón, los siguientes
5 tipos de productos son de interés dentro de la técnica del
interferón:

"Interferón bruto concentrado", que es un pro-
ducto usualmente preparado a partir del medio de cultivo
o incubación, por neutralización del virus inductor a pH 2
10 y precipitación con tiocianato potásico a pH 3,5. La abre-
viatura de este tipo de interferón es, usualmente, "CIF".
El CIF contiene una considerable cantidad de proteínas
acompañantes y, usualmente, muestra una estabilidad rela-
tivamente baja y una inmunogenicidad relativamente alta.

15 El "interferón parcialmente purificado" ("PIF"),
que es un producto que está considerablemente menos con-
taminado con proteínas acompañantes y que, por unidad de
volumen, contiene una actividad de interferón mucho mayor.
El PIF puede prepararse típicamente, a partir de interfe-
rón bruto, mediante precipitación con tiocianato potásico,
20 fraccionamiento con etanol y precipitación adicional con
tiocianato potásico.

Las preparaciones típicas del PIF se describen
por K. E. Mogensen y Kari Cantell en *Pharmac. Ther. A.*,
25 vol. 1, páginas 369 a 381, 1977.

El "PIF-B", es decir "interferón parcialmente pu-
rificado de tipo B", es un producto que contiene menos pro-
teínas contaminantes que el PIF, y que se prepara típica-
mente empleando, en la última etapa de la precipitación
30 con tiocianato potásico, una disminución de pH hasta sola

1 mente 4,7, en lugar de una disminución de pH hasta 3,0. En
el mismo artículo citado arriba de K.E. Mogensen y Kari
Cantell aparecen detalles adicionales concernientes a esta
preparación típica.

5 La invención se refiere también a preparaciones
farmacéuticas para administración parenteral a los seres
humanos, conteniendo dichas preparaciones interferón de
leucocitos porcinos como componente activo. Estas prepara-
ciones farmacéuticas contienen el interferón de leucocitos
10 porcinos en una forma que es tolerable para los seres huma-
nos por administración parenteral, es decir, que el inter-
ferón de leucocitos porcinos satisface los requerimientos
arriba indicados, en lo que respecta a que, en las immuno-
electroforesis, no muestra bandas que no sean idénticas a
15 las bandas del interferón de leucocitos humanos o del suero
agamma humano, cuando como anticuerpo precipitante se uti-
lizan proteína de suero humano antitotal, IgG antihumana,
IgA antihumana, IgM antihumana, albúmina antihumana e in-
terferón de leucocitos antihumanos, aparte de cualesquiera
20 bandas originadas por el medio en el cual ha sido propaga-
do un inductor de interferón biológico. Las preparaciones
farmacéuticas preferidas contienen el interferón de leuco-
citos porcinos en forma de PIF, que satisface las condicio-
nes arriba indicadas, en lo que respecta al comportamiento
25 inmunoeléctroforético. La administración de esta prepara-
ción farmacéutica de la invención, se adapta al caso clí-
nico particular, dependiendo de que se trate, bien sea por
ejemplo del tratamiento del cáncer o de una infección por
virus, o de hepatitis que están causadas presumiblemente
30 también por virus. Una directriz para la administración

1 para el tratamiento de cáncer, papilomas, enfermedades ví-
ricas y hepatitis, es la administración de 2,5 a 8 millones
de unidades internacionales, por vía parenteral, por ejem-
plo por vía intramuscular o subcutánea, por día y durante
5 30 días y, después, de 2,5 a 8 millones de unidades inter-
nacionales, tres veces por semana, durante hasta año y me-
dio. Otro aspecto de una preparación farmacéutica de acuer-
do con la invención, es un colirio que contiene interferón
de leucocitos porcinos, también preferiblemente en forma
10 de PIF. Tales colirios están indicados, por ejemplo, para
el tratamiento de la Herpes keratitis. Los colirios que
contienen interferón deben contener una elevada concentra-
ción, ya que solamente pueden aplicarse pequeñas cantidades
de ellos. Una aplicación intraespinal, es el empleo del in-
15 terferón de leucocitos porcinos en forma de PIF, indicada
para la encefalitis vírica, la esclerosis diseminada y los
tumores del sistema CNS. Aquí, se prefiere el uso de las
mismas dosis que se han indicado antes. Sin embargo, en
este caso, no es necesario efectuar la administración de
20 modo tan frecuente, puesto que el interferón abandona el
sistema CNS con más lentitud de lo que abandona la parte
restante del organismo. Finalmente, se considera que el in-
terferón de leucocitos porcinos puede ser utilizado en pul-
verizaciones nasales para el tratamiento de resfriados, tal
25 como se ilustra en la bibliografía referente al interferón
humano, y en las mismas cantidades de administración que se
indican en la bibliografía con este fin. Si no se utiliza
una de las administraciones típicas mencionadas, se puede
individualizar el tratamiento, midiendo, subsiguientemente
30 a la administración del interferón, la concentración de in-

1 -terferón en el suero o en los líquidos fisiológicos del
paciente. De acuerdo con la bibliografía, se debe tender
aquí a una concentración de 50 a 100 unidades internaciona
les por ml durante los primeros minutos a horas después de
5 la inyección intramuscular, o durante los primeros minutos
subsiguientes a la administración intravenosa (por adminis
tración intravenosa, la curva de actividad caerá bruscamen
te (exponencialmente) ya durante los primeros minutos).

10 Como se ha indicado antes, el interferón de leu
cocitos porcinos de acuerdo con la invención, con las pro
piedades indicadas en lo que respecta a la tolerancia para
los seres humanos, se obtiene evitando, durante la totali
dad del método de preparación, es decir, durante la recogi
da, aislamiento, iniciación, inducción e incubación de los
15 leucocitos porcinos para la producción de interferón, la
adición de fuentes de proteínas que no sean tolerables pa
ra los seres humanos. Esto se obtiene, utilizando, como
fuente de proteínas añadida en cualquiera de las etapas an
tes mencionadas, una fuente de proteínas que satisfaga los
20 requerimientos antes mencionados. Las fuentes de proteínas
preferidas que satisfacen los requerimientos antes mencio
nados, son el suero agamma porcino y la albúmina porcina,
que pueden prepararse de acuerdo con métodos en sí conoci
dos, tales como los que se ilustran en los ejemplos siguien
tes.
25

El hecho de que el suero agamma porcino y sus
fracciones, incluida especialmente la albúmina porcina y
la hemoglobina porcina procedente de eritrocitos hemoliza
dos, no muestre, en las inmunoelectroforesis realizadas uti
lizando los anticuerpos antes mencionados, bandas que no
30

1 aparezcan en el suero humano, se utiliza en otro aspecto
de la invención: Este aspecto está constituido por tales
procedimientos para la obtención, o utilizados en la obteni-
ción, de preparaciones farmacéuticas que contienen proteí-
5 nas, para la administración parenteral a los seres humanos,
en que se cultivan células o tejidos en un medio nutriente
que contiene una fuente de proteínas, y se obtiene un ma-
terial producido por las células o cultivado en las celu-
las, y se purifica opcionalmente después, caracterizándose
10 este aspecto de la invención por utilizar, como fuente de
proteínas, suero agamma porcino o una fracción del mismo,
incluida especialmente la albúmina porcina o la hemoglobi-
na porcina originada de eritrocitos porcinos hemolizados.
Se entenderá que los procedimientos de este tipo son todos
15 aquellos procedimientos en los que se preparan por ejemplo
vacunas para administración parenteral a los seres humanos,
por ejemplo, vacuna poliomielítica, factor de transferen-
cia, etc.

En la técnica conocida, se han utilizado para es-
20 tos fines suero humano o diversos materiales no humanos.
Sin embargo, la disponibilidad de suero humano está limi-
tada por el número de donantes, y los materiales no huma-
nos, tales como albúmina bovina, suero de ternera fetal,
etc., pueden dar lugar a reacciones de hipersensibilidad en
25 los pacientes. Utilizando los materiales porcinos de acuer-
do con la invención, se evitan tales reacciones de hiper-
sensibilidad, y los materiales porcinos están disponibles
en cantidades muy considerables.

Otro aspecto de la invención es el uso de albúmi-
30 na porcina como agente de expansión del plasma para estados

1 de choque, en lugar de la albúmina humana o de otros agen-
tes de expansión del plasma anteriormente empleados. Asi-
mismo, en este aspecto, la invención utiliza el hecho de
que la albúmina porcina es tolerada por los seres humanos
5 y se obtienen ventajas, también, en lo que respecta a la
disponibilidad de un material más barato y en cantidades
mayores que la albúmina humana, y en lo que respecta a una
tolerancia mejor que la de los agentes de expansión del
plasma no humano, conocidos.

10 En lo que se refiere a los aspectos antes mencio-
nados, de acuerdo con los cuales se utiliza suero agamma
porcino, albúmina porcina o hemoglobina porcina, como fuen-
te de proteínas añadida para los medios relacionados con la
obtención de preparaciones farmacéuticas para uso parente-
15 ral, es de señalar que los principios utilizados en rela-
ción con este aspecto de la invención, son los mismos que
se han expuesto con detalle antes, en relación con su rea-
lización especial y muy importante, constituida por la pre-
paración de interferón de leucocitos porcinos, empleando
20 como fuente de proteínas añadida el suero agamma porcino,
la albúmina porcina o la hemoglobina porcina.

En lo que se refiere a los detalles operativos,
la preparación y purificación del interferón de leucocitos
porcinos puede efectuarse de una manera completamente aná-
25 loga a la del procedimiento descrito por K. E. Mogensen y
Kari Cantell en *Pharmac. Ther. A.*, volumen 1, páginas 369
a 381, 1977, tal como se ilustra también en los ejemplos
siguientes, los cuales ilustran, al mismo tiempo, unas po-
cas diferencias pequeñas, pero sustanciales, en comparación
30 con el procedimiento descrito en dicha referencia biblio-

1 gráfica: el uso de medio esencial mínimo de Eagle con sal
de Hank, en lugar de con sal de Earle, puesto que se ha en-
contrado que los leucocitos porcinos tienen mejor éxito con
la sal de Hank que con la sal de Earle, y la adición de un
5 agente formador de quelatos de calcio y magnesio para evi-
tar la aglutinación de los leucocitos porcinos, de otro mo-
do considerable. Se ha encontrado que el K_2EDTA es un ade-
cuado agente de formación de quelatos de calcio y magnesio.

Como inductor en el procedimiento de la invención,
10 se utiliza preferiblemente virus 1 paragripal Sendai, que
está en analogía con los métodos de acuerdo con Mogensen
y Cantell, pero en contraste con las preparaciones de in-
terferón de leucocitos porcinos descritas en la bibliogra-
fía. Sin embargo, es de señalar que cuando se prepara el
15 interferón de leucocitos porcinos, se deben emplear canti-
dades mayores de virus Sendai, que cuando se prepara inter-
ferón de leucocitos humanos como se describe en la biblio-
grafía. Cantidades añadidas preferidas de virus Sendai son
de 200 a 400 unidades HA por ml MEM/mezcla de leucocitos.
20 Parece preferirse el uso de virus Sendai, pero también pue-
den utilizarse para la preparación del interferón de leuco-
citos porcinos, otros inductores de interferón de los di-
versos tipos bien descritos en la bibliografía, incluidos
el virus NDV (virus de la enfermedad de Newcastle), el vi-
25 rus VSV (virus de la estomatitis vesicular) o el virus Sen-
dai Harris.

Se hace referencia ahora a los dibujos:

La figura 1 muestra una inmunolectroforesis Gra-
bar sobre gel de agarosa. En el orificio superior, se han
30 aplicado 10 microlitros de suero humano, en el orificio me-

1 — dio se han aplicado 10 microlitros de suero humano, y en
el orificio inferior se han aplicado 10 microlitros de
suero agamma humano. La electroforesis se ha efectuado a
150 voltios, durante 90 minutos. Después, en la ranura su-
5 perior se ha aplicado proteína de suero total antihumano
de conejo, y en la ranura inferior se ha aplicado IgA anti-
humano de conejo. Se advierten trazas de IgA correspondien-
tes al punto de aplicación del suero agamma.

La figura 2 muestra una inmunoelectroforesis Gra-
10 bar sobre gel de agarosa. En el orificio superior se han
aplicado 10 microlitros de suero humano, en el orificio
medio se han aplicado 10 microlitros de suero humano, y en
el orificio inferior se han aplicado 10 microlitros de
suero agamma humano. La electroforesis se ha efectuado a
15 150 voltios, durante 90 minutos. Después, en la ranura su-
perior se ha aplicado suero total antihumano de conejo,
y en la ranura inferior se ha aplicado IgM antihumano de
conejo. Se advierten trazas de IgM alrededor del punto de
aplicación del suero agamma humano.

La figura 3 muestra una inmunoelectroforesis Gra-
20 bar sobre gel de agarosa. En el orificio superior se han
aplicado 10 microlitros de suero humano, en el orificio me-
dio se han aplicado 10 microlitros de suero porcino, y en
el orificio inferior se han aplicado 10 microlitros de sue-
25 ro humano. La electroforesis se ha efectuado a 150 voltios
durante 90 minutos. Después, en la ranura superior se ha
aplicado proteína de suero total antihumano de conejo, y
en la ranura inferior se ha aplicado IgG antihumana de co-
nejo. Se advierte la identidad entre el suero humano y el
30 suero porcino, en lo que respecta a la IgG, ya que existe

1 fusión en los extremos, tanto de la ranura superior como
de la inferior. Además, se advertirá una migración sustan-
cialmente idéntica de las proteínas precipitantes que se
originan, por un lado, del suero humano y, por otro lado,
5 del suero porcino.

La figura 4 muestra una inmunolectroforesis cru-
zada en tandem, modificada de acuerdo con Freeman. En el
orificio de aplicación hacia el extremo derecho, se han
aplicado 10 microlitros de suero humano y, en el punto de
10 aplicación hacia la izquierda del mismo, se han aplicado
10 microlitros de plasma porcino. La electroforesis se ha
efectuado a 150 voltios durante 120 minutos, después de lo
cual se ha cortado la plancha de electroforesis y se ha
colocado contra un gel de agarosa que contiene 0,75 micro-
15 litros de albúmina antihumana de conejo por cm^2 . Después
de esto, la electroforesis se ha efectuado perpendicular-
mente a la longitud de la plancha, durante 18 horas, a
60 voltios. En la parte izquierda de la figura, se ve que
son idénticos los dos precipitados de albúmina que se ori-
ginan del plasma porcino y del suero humano, respectivamen-
20 te. Además, en la parte media de la figura, se ve un preci-
pitado difuso, que consiste en dos picos, uno de los cua-
les es considerablemente más alto que el otro. Este preci-
pitado difuso representa albúmina-proteína combinada. Se
25 advierte la identidad entre el pico pequeño que se origina
del plasma porcino, y el pico alto, que se origina del sue-
ro humano. Además, debajo de los picos difusos, se advier-
te un precipitado claro, que consiste también en dos pre-
cipitados fundidos (donde es difícil distinguir entre los
30 dos picos). Estos picos más claros representan también

1 - albúmina-proteína combinada. No se advierten cruzamientos
entre estos dos picos.

5 La figura 5 muestra una inmunoelectroforesis
cruzada en tandem, de la misma clase que se muestra en la
figura 4. En el orificio de aplicación hacia el extremo de
recho, se han aplicado 20 microlitros de PIF-H, es decir,
"interferón parcialmente purificado" humano, y, en el ori-
ficio de aplicación hacia la izquierda del mismo, se han
aplicado 20 microlitros de PIF-P, es decir "interferón
10 parcialmente purificado" porcino. La electroforesis se ha
efectuado como se ha descrito en relación con la figura 4.
Como anticuerpo, se ha utilizado proteína de suero total
antihumana de conejo, en una concentración de 4,0 microlit-
tros/cm². En total, se advertirán cuatro bandas dobles,
15 marcadas, respectivamente, con A, B, C, y D. Existe una
completa identidad entre, por una parte, el PIF-P y, por
otra parte, el PIF-H, correspondiente a estas cuatro pre-
cipitaciones.

20 La figura 6 muestra una inmunoelectroforesis cru-
zada en tandem, de la misma clase que se muestra en la fi-
gura 4. En el orificio de aplicación hacia el extremo de-
recho, se han aplicado 20 microlitros de PIF-H, y en el
orificio de aplicación hacia la izquierda del mismo, se
han aplicado 20 microlitros de PIF-P. La electroforesis se
25 ha efectuado de la misma manera que se ha descrito en re-
lación con la figura 4, y, como anticuerpo, se ha utiliza-
do albúmina antihumana de conejo, en una concentración de
0,75 microlitros/cm². Como se ha marcado con A, se adver-
tirá la identidad entre la albúmina del PIF-P y la albúmi-
30 na del PIF-H. En lo que corresponde a B, se advertirá la

identidad/entre la albúmina-proteína combinada del PIF-P y del PIF-H, respectivamente. En lo que corresponde a C, se advertirá un sólo precipitado difuso, que se origina de la albúmina de huevo que está presente en mayores cantidades en el PIF-H, y que se origina del líquido alantoico, en el cual se ha propagado el virus Sendai utilizado como inductor de interferón. (Mediante una electroforesis rápida de Laurell, se ha comprobado que la misma porción de PIF-H contiene cantidades considerablemente mayores de albúmina de huevo. En el PIF-P, la misma electroforesis rápida de Laurell mostró solamente un pequeño precipitado difuso, que emigró hasta un poco más lejos que la albúmina restante presente en el PIF-P.).

La figura 7 y la figura 8 muestran unas electroforesis de gradiente con gel de poliacrilamida (PAGE), efectuadas en SDS. En cada figura, se aplican marcadores moleculares sobre la plancha derecha con pesos moleculares (empezando desde abajo) 12.000, (1), 17.800, (2) y 25.000, (3). Además, sobre los marcadores moleculares, se indica albúmina (45.000), (4) y, además, un marcador molecular a 67.000, (5). Las planchas izquierdas de ambas figuras 7 y 8, muestran, respectivamente, el PIF-H (figura 7) y el PIF-P (figura 8). En lo que corresponde al PIF-P, se advertirán indicaciones para pesos moleculares 12.400, 17.800 y 25.000. Los mismos marcadores de peso molecular pueden ser representados gráficamente en la figura 7. La figura 9 muestra el mismo tipo de electroforesis de gradiente, con los mismo marcadores moleculares sobre la plancha derecha, pero con una preparación de PIF-H conocida (donación de Kari Cantell, véase Pharmac. Ther. A., Volumen 1, páginas 369 a 381, 1977). Se advertirá una dis-

1 -tribución sustancialmente idéntica de las bandas de proteí
na, entre las tres diferentes PIF que se muestran en la fi
gura 7, figura 8 y figura 9, respectivamente.

5 Ejemplo 1

Preparación de interferón de leucocitos porcinos,
utilizando suero humano como proteína añadida.

A. Preparación de linfas cuajadas

10 1) Se recogió sangre al sacrificar cerdos de la
raza Danish Landrace, que tenían un peso corporal de apro-
ximadamente 90 kg. Después de la anestesia, se lavaron los
cuellos con solución de hipoclorito sódico, y la punción y
el desangrado se efectuaron con cuchillos tubulares estéri
15 les, a través de tubos de poliamida estériles, a frascos
de polipropileno que contenían 600 ml de ACD-citrato. De
cada cerdo se extrajeron de 2,5 a 3,0 litros de sangre. La
sangre se mezcló cuidadosamente con la solución de citrato
y, después, se enfrió a 4°C. En total, se extrajo sangre
20 de 12 cerdos.

2) La sangre de cerdo estabilizada y enfriada se
transfirió, en condiciones estériles, a frascos de infusión,
de vidrio, de 500 ml, los cuales fueron centrifugados du-
rante 20 minutos a 2100 revoluciones por minuto, a 4°C. De
25 cada frasco de 500 ml, se extrajo por succión la capa de
plasma y, después, se transfirieron de 15 a 20 ml de mezcla
de leucocitos/eritrocitos a una probeta graduada estéril de
100 ml. Las linfas cuajadas de la totalidad de los 12 cer-
dos se reunieron. Las probetas se mantuvieron durante una
30 noche a 4°C.

1 B. Preparación de interferón bruto.

La cantidad total de linfas cuajadas (1.260 ml) se trató con 9 litros de una solución de cloruro amónico al 0,83%, durante 10 minutos, a 4°C.

5 La mezcla de linfa cuajada/cloruro amónico se centrifugó en una centrífuga de cesta Damon/IEC, a 3500 revoluciones por minuto, con una alimentación de 500 ml por minuto. El líquido sobrenadante en el cuenco de la centrífuga, se extrajo por succión y se volvió a suspender la ca
10 pa leucocitaria en 200 ml de FBS de Dulbecco, sin calcio ni magnesio, mezclados con 0,5% de etilendiamintetraacetato dipotásico. Después, se repitió el tratamiento con solución de cloruro amónico al 0,83% (10 minutos a 4°C), y se centrifugó la mezcla en una centrífuga con refrigeración,
15 a 800 revoluciones por minuto, a 4°C, durante 25 minutos. El líquido sobrenadante se extrajo por succión, y los leucocitos se volvieron a suspender en 50 ml de medio esencial mínimo de Eagle, con sal de Hank mezclada con un 9% de suero humano, del cual se habían precipitado las gammaglobulinas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y el cual tenía una concentración
20 de proteínas de 2.400 mg/100 ml. El medio había sido mezclado, además, con 3 mg de tricina y 25 microgramos de neomicina por ml. La concentración de leucocitos en el medio se ajustó a 10^7 células por ml, por la adición de medio adicional.
25

La mezcla de leucocitos y medio esencial mínimo se distribuyó en seis matraces de fondo redondo, de 2.000 ml, con un contenido de 930 ml cada uno de ellos. A cada matraz se añadieron 0,6 ml de interferón de leucocitos, con
30 centrado, bruto, humano, que contenía 160.000 unidades in-

1 -ternacionales de interferón por ml. Por ello, la concentra-
ción final fue de 100 unidades internacionales de interfe-
rón por ml de mezcla de leucocitos y medio esencial mínimo.
Los matraces se sometieron a la acción de un baño de agua
5 a 37,5°C, con agitación con un imán en aspa, y se taparon
de una manera suelta, con hoja de aluminio. Dos horas más
tarde, se añadieron a cada matraz 49 ml de suspensión de
virus Sendai, que contenía 8.000 unidades HA de virus por
ml. Se continuó la incubación sobre baño de agua durante
10 18 horas más. Después, se centrifugaron los contenidos de
los matraces, a 2.000 revoluciones por minuto, a 4°C, du-
rante 40 minutos. El líquido sobrenadante, que es el inter-
ferón bruto, se congeló a -40°C después de retirar 1 ml
por matraz, para determinar su concentración.

15 C. Concentración y purificación a "interferón
parcialmente purificado" porcino (PIF-P).

El interferón bruto (5.500 ml) se precipitó a
pH 3,50, en presencia de sulfocianuro potásico (KSCN) 0,5
molar. El precipitado se disolvió en 1.100 ml de etanol de
20 95%, a -20°C y a un pH 4,45. Después, se aumentó gradualmen-
te el pH, primeramente hasta 5,45. El precipitado se dese-
chó. Se aumentó el pH a 5,80 y se retiró un precipitado adi-
cional. Después, se aumentó el pH a 8,00, y el nuevo preci-
pitado, que contenía la cantidad principal de interferón,
25 se disolvió en 110 ml de tampón de fosfato a pH 8,00. Al
día siguiente, se precipitaron de nuevo el interferón y
otras proteínas, a un pH 3,00, en presencia de KSCN 0,5 mo-
lar. El precipitado se volvió a disolver en 6 ml de PBS de
Dulbecco y se ajustó el pH de la solución a 7,82, añadiendo
30 0,075 ml de NaOH 2 N. La solución se transfirió a un tubo

1 flexible de diálisis y se dializó contra 1.000 ml de PBS.
El líquido de diálisis se cambió al cabo de las 24 horas y,
después de 24 horas adicionales de diálisis, se centrifugó
la solución durante 60 minutos, a 25.000 revoluciones por
5 minuto y 2°C. El líquido sobrenadante es el PIF-P final.

Se efectuó la investigación bacteriológica, sembrando 0,1 ml sobre la superficie de agar de infusión de cerebro y corazón (Difco) mezclado con un 5% de sangre de caballo desfibrinada, seguido por una incubación aerobia
10 y anaerobia, durante 3 a 4 días, a 37°C. En las placas no se advirtió ningún crecimiento.

Ejemplo 2

Preparación de interferón de leucocitos porcinos,
15 utilizando suero porcino como proteína añadida.

A. Preparación de suero agamma porcino.

Sangre de cerdo estabilizada con ACD, extraída y tratada como se ha descrito en el Ejemplo 1 A 1), se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto, a 4°C, durante 7
20 minutos. La capa de plasma se extrajo por succión. Se añadieron 11,2 ml de solución de cloruro cálcico (10%) por cada 100 ml de plasma. El plasma se puso sobre un baño de agua a 37,5°C, para su coagulación. Después, el plasma se
25 dejó en reposo durante 18 horas a 4°C. El plasma así convertido en suero, se centrifugó a 3.500 revoluciones por minuto, durante 40 minutos, a 4°C. A una porción de 10 litros del suero porcino así preparado se añadieron con agitación, 5.385 ml de solución de sulfato amónico saturada,
30 enfriada con hielo. Esto corresponde a una saturación del

1 -35% con sulfato amónico, con lo que precipitaron, entre
otras cosas, las gammaglobulinas. La mezcla del líquido y
el precipitado se centrifugó a 2.500 revoluciones por mi-
nuto, durante 10 minutos, a 4°C. El líquido sobrenadante
5 era suero agamma. Este suero agamma se dializó contra so-
lución salina fisiológica fría (10 veces el volumen) duran-
te 48 horas, con dos cambios, en frigorífico. El valor del
pH se ajustó a 7,4. Después, el suero agamma se filtró en
condiciones estériles a través de un filtro Sartorius, con
10 el tamaño de poro más pequeño, 0,22 micras. El suero agamma
se vertió en frascos estériles de 500 ml, con tapón de ros-
ca estéril. La determinación bacteriológica se efectuó de
la misma manera que se ha descrito para el PIF-P en el
ejemplo 1. Después, se efectuaron la electroforesis zonal
15 sobre acetato de celulosa, y la determinación de la concen-
tración de proteínas. El suero agamma se ajustó a una con-
centración de proteínas de aproximadamente 2.500 mg/100 ml,
por medio de solución salina fisiológica estéril.

20 B. Después, se efectuaron la preparación del in-
terferón bruto y la purificación del interferón, exactamen-
te de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1,
pero utilizando cada vez, en lugar del suero humano, la mis-
ma cantidad del suero agamma porcino preparado de la manera
descrita antes.

25 Las determinaciones ilustradas en las figuras, se
efectuaron con una producción de PIF-P, cuya preparación
se efectuó utilizando 5 partes de interferón bruto prepara-
do como se ha descrito en el Ejemplo 1, y una parte de in-
terferón bruto preparado como se ha descrito en el presente
30 ejemplo.

1

Ejemplo 3Preparación de albúmina porcina

Al plasma porcino, extraído y tratado como en el
Ejemplo 1 A 1), se añadió un 12% en peso/volumen de poli-
etilenglicol 4.000 (polietilenglicol con un peso molecular
de 4.000) en forma sólida, a pH 8, con lo que precipitó la
mayor parte de las proteínas del plasma con un peso molecu-
lar alto, tales como las lipoproteínas y el fibrinógeno,
así como la IgG. La mezcla resultante de líquido y preci-
pitado, se centrifugó a 2.500 revoluciones por minuto, du-
rante 10 minutos, a 4°C. La cantidad de albúmina del líqui-
do sobrenadante se determinó mediante electroforesis rápi-
da de Laurell. Después, se rebajó el pH a 4,6 y se añadió
polietilenglicol 4.000 sólido adicional, hasta que se hu-
bo obtenido una saturación del 25% en peso/volumen. De es-
te modo, se precipitó la albúmina. La mezcla de líquido y
precipitado se centrifugó a 2.500 revoluciones por minuto,
durente 10 minutos, a 4°C. El precipitado se lavó con agua
destilada en aparato de vidrio, a 4°C. Después, se añadió
tampón PBS de Dulbecco (pH 7,3, menos calcio y magnesio)
hasta que se consiguió una concentración de albúmina de
cuatro veces la concentración determinada por la electrofo-
resis rápida de Laurell arriba mencionada. Agitando magné-
ticamente, se añadió una solución estéril de hidróxido só-
dico 0,1 N, hasta pH 7,0.

30

La albúmina así disuelta nuevamente, se aplicó
a una columna cambiadora de iones DEAE Sephadex^(R) A50,
equilibrada con el tampón PBS de Dulbecco anteriormente men-
cionado, ajustado a pH 7,0. Después, el pH en la columna se

1 -ajustó a 4, mediante la adición de tampón de citrato, con-
centración iónica 0,07. Se eluyó la albúmina a pH 4,6. Agi-
tando, se añadió al eluato solución de tiocianato potásico
5 molar, en una cantidad tal que la concentración final re-
5 sultó ser 0,5 molar. El pH se disminuyó hasta 3,5, con lo
que precipitó la albúmina. El líquido sobrenadante se sepa-
ró por centrifugación a 2.000 revoluciones por minuto, du-
rante 25 minutos, a 2°C. El precipitado se volvió a suspen-
der con tampón PBS de Dulbecco (pH 7,3, menos calcio y mag-
10 nesio) hasta una concentración de albúmina correspondiente
a 4 veces el valor determinado mediante electroforesis rá-
pida de Laurell, como se ha descrito arriba. Se ajustó el
pH a 7,3, con solución de hidróxido sódico estéril y fría
y, después, se vertió la solución en un tubo flexible de
15 diálisis y se dializó durante 2 días contra un volumen 100
veces mayor de tampón PBS de Dulbecco (pH 7,3, menos calcio
y magnesio) a 4°C, con cambio del líquido de diálisis por
líquido de diálisis de nueva aportación, después de unas
24 horas. De este modo, se separó cianato potásico de la
20 solución. La concentración de albúmina final se determinó
mediante electroforesis rápida de Laurell. La solución de
albúmina purificada así obtenida, se filtró en condiciones
estériles, a través de un filtro Sartorius, en el cual la
medida mínima de poro es de 0,22 micras. La solución de al-
25 búmina estéril resultante, es adecuada como adición de pro-
teína para la preparación de PIF porcino, PIF humano y PIF
preparado a partir de células linfoplastoides, tales como
células Namalva, como agente de expansión del plasma para
administración intravenosa a los seres humanos, como esta-
30 bilizador de la albúmina en las preparaciones parenterales.

1 y como adición de proteínas para medios de cultivo, para ser utilizados en la obtención de preparaciones parenterales biológicamente activas a partir de cultivos de células/tejido.

5

Ejemplo 4

Determinación de la concentración de interferón porcino

10

15

20

25

30

Se emplea el siguiente método: una capa única de células de pulmón humano embrionario (HEL) se incuba con la muestra de interferón en cuestión (en diversas diluciones, por ejemplo se efectúa una dilución secuencial en tres etapas) durante una noche. Al día siguiente, se retira la muestra de interferón y se sustituye por una solución de virus (virus de estomatitis vesicular, VSV) de una concentración predeterminada. Al día siguiente, se leen las valoraciones de acuerdo con el siguiente principio: las células que han "recibido suficiente" interferón, no serán destruidas por el VSV, mientras que las células que no han recibido interferón (o muy poco) serán destruidas. Siguiendo una secuencia de dilución de una muestra particular, se puede determinar fácilmente dónde se ha situado el cambio. El punto final de la valoración se define como la dilución de la muestra de interferón que proporciona justamente una protección del 50% de la capa celular. Este principio se describe, por ejemplo, por Finter, N. (ed.): Interferon and Interferon Inducers (1973); Finter, N.: The Assay and Standardization of Interferon and Interferon Inducers. Se han utilizado dos métodos: A) el micrométodo, y B) el método

1 do "semi-macro".

5 En los análisis de rutina, se utiliza el método A, puesto que este método es relativamente menos laborioso que el B. Se siembran bandejas de plástico (96 orificios "planos") con células, etc. Sobre cada bandeja para micro-análisis, se incluye siempre un patrón de laboratorio interno. Esta referencia se compara una vez al mes con el patrón de referencia internacional (69/19B), de tal manera que todas las determinaciones se establecen invariablemente en unidades 69/19B, que es el método típico para los laboratorios de interferón (Finter, loc. cit.).

15 En el método B, se utilizan tubos de ensayo (vidrio reforzado con alambre) con tapones de caucho. La cantidad de células por capa única es aproximadamente 10 veces mayor que en A. Si han de efectuarse determinaciones muy exactas, se utiliza el método B, ya que la incertidumbre de una sola determinación es considerablemente menor en el método B, que en el método A. En ambos métodos A y B, se incluye como control, también, una "muestra de interferón concentrado bruto" del profesor Kari Cantell (Cantell-CIF 500.000 IFU/ml). Normalmente, existe siempre una total conformidad entre las tres "referencias" (el patrón de laboratorio interno 4, 69/19B, Cantell-CIF).

25 En cada uno de los 5 matraces de incubación, conteniendo cada uno de ellos 980 ml de interferón bruto, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1 B (después de la centrifugación y antes de la congelación), se ha efectuado una determinación de la concentración, de acuerdo con el método A arriba descrito: Se han obtenido las siguientes concentraciones (en unidades internacionales de interferón):

1	Matraz 1 :	40.000
	Matraz 2 :	50.000
	Matraz 3 :	36.000
	Matraz 4 :	25.000
5	Matraz 5 :	120.000

En un matraz con 980 ml de interferón bruto, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 2 B, es decir el material correspondiente al Ejemplo 1, pero preparado utilizando suero γ porcino, se encontró que la concentración era: 109.000 unidades internacionales de interferón.

Una determinación de la actividad del PIF, realizada de la misma manera, mostró una concentración del orden de 100 veces. Durante los métodos de concentración y purificación, se encuentra una pérdida del 50 al 80% de la actividad del interferón, calculada con relación a la concentración antes mencionada. Se advierte que al determinar la concentración del interferón porcino, no hubo ningún signo de ningún efecto fitotóxico para las células humanas.

Se preparó también interferón porcino como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, pero utilizando otros inductores de virus, incluido el NDV Hitchner y el NDV Tokyo. Se encontró que el NDV Hitchner no induce el interferón porcino, pero que empleando 50, 70 y 100 unidades HA respectivamente, de NDV Tokyo, se obtenía una concentración de 10.000 unidades internacionales de interferón en los sistemas de células de ensayo humanas que se han descrito antes.

Ejemplo 5

Neutralización del interferón porcino con inter-

1 ferón de leucocitos antihumanos, producidos en oveja

El interferón de leucocitos porcinos reacciona en cruz parcialmente (hasta aproximadamente un "25 %") con el interferón de leucocitos antihumanos (antisuero producido en oveja por medio de PIF-H).

En principio, se hace lo siguiente: 1) primeramente, se determina, como se describe en el Ejemplo 4, la concentración del interferón porcino en el sistema humano. 2) Después, se efectúa el apropiado ensayo de neutralización (también en el sistema humano).

Observación 1). Se efectúa una dilución secuencial en tres etapas de P-019-3 (una tanda de interferón bruto preparado como se describe en el Ejemplo 1B), partiendo de, por ejemplo, 1:1000 (después 1:3.000, etc.). Estas diluciones se incuban sobre bandejas para microanálisis (que han sido sembradas previamente con 30.000 - 40.000 células humanas) hasta el día siguiente, después de lo cual se reemplazan las diluciones con una solución de VSV (virus de estomatitis vesicular) de una concentración pre-determinada. Al día siguiente, se leen las valoraciones de acuerdo con el siguiente principio: la protección del 50% de las células se utiliza como "punto final". Se encontró que la P-019-3 podía ser diluida 20.000 veces y todavía daba lugar a una protección del 50% de las células en dilución (1:3). En otras palabras, la concentración es 60.000 (en el sistema en cuestión-sistema HEL-célula - 1 unidad 69/19B = 1 "unidad de laboratorio" = 1 4/4 referencia, 74 - unidad). Así, se puede preparar una solución de 3 unidades porcinas (en el sistema humano), diluyendo primero 20.000 veces y, después, 3 veces. Se prepararon soluciones de

1 - P-019-3, de 20, 10 y 5 unidades porcinas/ml, respectivamente. Al mismo tiempo, se prepararon soluciones de interferón correspondientes, de interferón de leucocitos humanos (4/4 ref.-74) : 20, 10 y 5 IFU/ml.

5 Observación 2). Se efectuó una dilución secuencial en dos etapas, de interferón de leucocitos antihumanos, partiendo de 1:500 (1:1000, 1:2.000 hasta 1:1.024.000). A cada dilución de antisuero se añadió la misma cantidad de unidades porcinas de P-019-3 (0,5 ml de P-019-3), que correspondía a 20 unidades/ml + 0,5 ml de interferón antihumano (1:500), después 0,5 ml de P-019-3 (20 unidades/ml) + 0,5 ml de interferón antihumano (1:1000, etc. hasta 1:1.024.000). Se dejó en reposo durante una hora, a 37°C. Después, se ensayó la mezcla (1 ml) para determinar la actividad de interferón en el sistema humano, como se ha descrito antes. La protección del 50% se toma como punto final de la valoración de anticuerpos. Por ejemplo, la dilución 1:16.000 (de antisuero de interferón) dió una protección del 50% de las células, cuando se utilizaron 5 unidades de P-019-3. Con unidades de interferón humano (4/4 ref.-74), el cambio aparece solamente a 1:256.000. Esto significa que el interferón porcino (de la tanda P-019-3) reacciona en cruz con el interferón humano, hasta un grado de aproximadamente el 10%.

25

Cromatografía de afinidad.

30

Los resultados anteriores en lo que respecta a la neutralización, se confirmaron mediante una cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Sepharose^(R) 4B CNBr, a la cual se había acoplado, y de este modo inmo-

1 vilizado, anti-PIF-H de oveja. Cuando se aplicó a la columna el interferón de leucocitos porcinos de la tanda P-019-3, y se eluyó después, la columna retuvo aproximadamente el 25% de la actividad original del interferón de leucocitos porcinos, mientras que en el eluato se determinó aproximadamente el 75% de la actividad original del interferón de leucocitos porcinos (de la manera descrita arriba).

Ejemplo 6

10 Tolerancia del PIF-P en los seres humanos.

En 5 voluntarios, se inyectó intramuscularmente (1 ml), el mismo PIF-P que se caracteriza en las figuras. Antes de la inyección de la PIF-P, se extrajo una muestra de sangre. 8 días después de la administración de la PIF-P, se extrajo de nuevo una muestra de sangre. Las dos muestras de sangre extraídas de cada paciente, se ensayaron para determinar los anticuerpos precipitantes contra el PIF-P, mediante inmunodifusión de Ouchterlony. No se encontraron precipitados. A 3 de los 5 voluntarios, se les administró por vía intramuscular (1 ml), después de un intervalo de 14 días, una inyección adicional de iniciación, de PIF-P. No se encontraron efectos secundarios, especialmente no se encontró ninguna reacción de hipersensibilidad.

25 Ejemplo 7

Producción de interferón de linfoblastoide humano (Namalva)

Se cultivaron células de Namalva en un medio RPMI 1640, mezclado con un 15% de suero agamma humano. Las células se prepararon como se ha descrito por Strander y

1 otros, J. Clin. Microbiol., volumen 1, 116 - 117, 1975. En
la producción del interferón de linfoblastoides, se utili-
zaron como inductor, 150 unidades HA de virus Sendai por
ml de medio. El procedimiento para preparar el interferón
5 de linfoblastoides a partir del medio de cultivo, se efec-
tuó también como lo describe H. Strander y otros, loc. cit.,
aparte del hecho de que en el medio de incubación, se uti-
lizó, en lugar de suero de ternera fetal, suero agamma
humano, en la misma cantidad. De este modo, se han obteni-
10 do concentraciones de aproximadamente 45.000 unidades in-
ternacionales de interferón por ml.

El suero agamma humano puede ser sustituido to-
tal o parcialmente, por suero agamma porcino o por albúmi-
na porcina, preparados como se ha descrito en los ejemplos
15 2 y 3, respectivamente.

De acuerdo con este ejemplo, un aspecto de la
presente invención comprende la preparación de interferón
de linfoblastoides humanos, cultivando células linfoblas-
toides humanas, utilizando como fuente de proteínas añadi-
20 da para el cultivo, suero agamma humano, plasma agamma hu-
mano, albúmina humana, hemoglobina humana procedente de
eritrocitos hemolizados, suero agamma porcino, plasma
agamma porcino, albúmina porcina o hemoglobina porcina pro-
cedente de eritrocitos hemolizados, tratando las células
25 con un inductor de interferón, incubándolas y obteniendo
el interferón resultante, utilizando como fuente de proteí-
nas añadida para la incubación, suero agamma porcino, plas-
ma agamma porcino, albúmina porcina o hemoglobina porcina
procedente de eritrocitos hemolizados (el uso de suero
30 agamma humano para la incubación de células linfoblastoides

1 humanas, lo describe Kari Cantell (Ann. N.Y. Acad. Sci.,
volumen 173, páginas 160 a 168, 1970)).

5

10

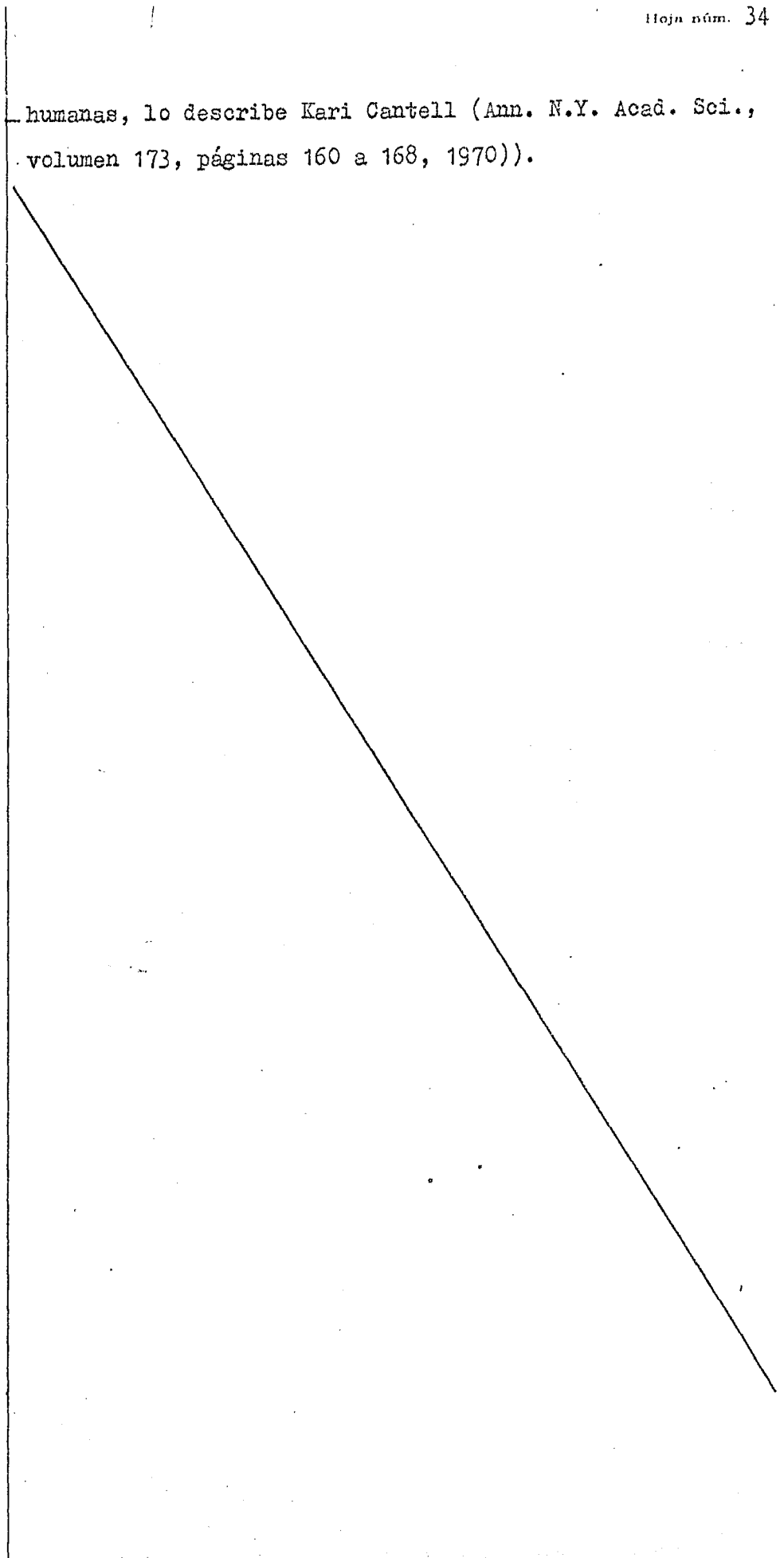
15

20

25

30

4128



REIVINDICACIONES

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

1ª.- Un procedimiento para preparar interferón de leucocitos porcinos, exógeno, en el cual los leucocitos porcinos se cosechan, aíslan, se ceban opcionalmente, se tratan con un inductor de interferón y se incuban, y se obtiene el interferón formado, que comprende utilizar, como fuente de proteínas añadida, en cualquiera de las etapas anteriormente mencionadas, una fuente de proteínas, la cual, en la inmunolectroforesis, está sustancialmente libre de bandas que no sean idénticas o parcialmente idénticas a las bandas del suero agamma humano, cuando se utiliza, como anticuerpo precipitante, proteína de suero humano antitotal, IgG antihumana, IgA antihumana, IgM antihumana y albúmina antihumana.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual la fuente de proteínas se selecciona del grupo que consiste en suero agamma humano, plasma agamma humano, albúmina humana, hemoglobina humana procedente de eritrocitos hemolizados, suero agamma porcino, plasma agamma porcino, albúmina porcina y hemoglobina porcina procedente de eritrocitos hemolizados.

3ª.- Un procedimiento para preparar interferón

1 de leucocitos porcinos, exógeno.

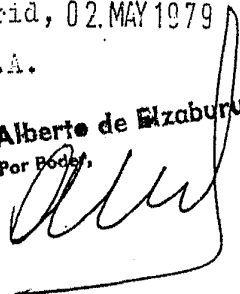
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de treinta y seis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 02.MAY.1979

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder.



10

15

20

25

30

30049

P 70 3 23

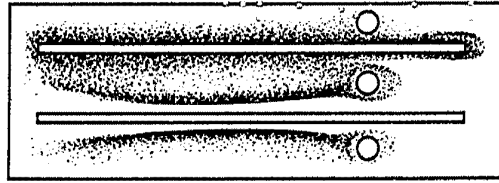


Fig. 1.



Fig. 2.

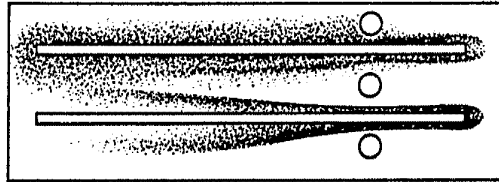


Fig. 3.

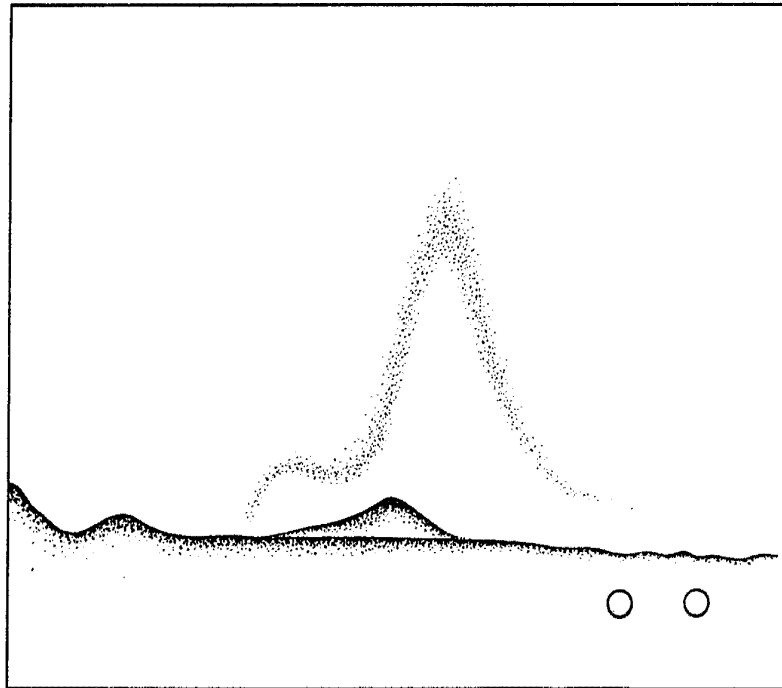


Fig. 4.

Alberto de Mizaburu
Por Poder

P70323

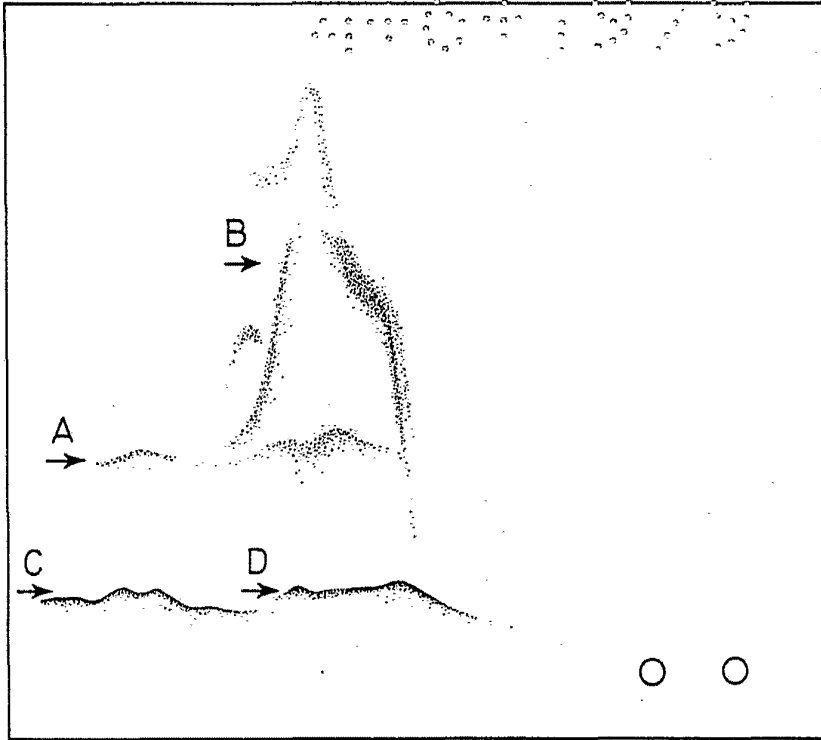


Fig. 5.

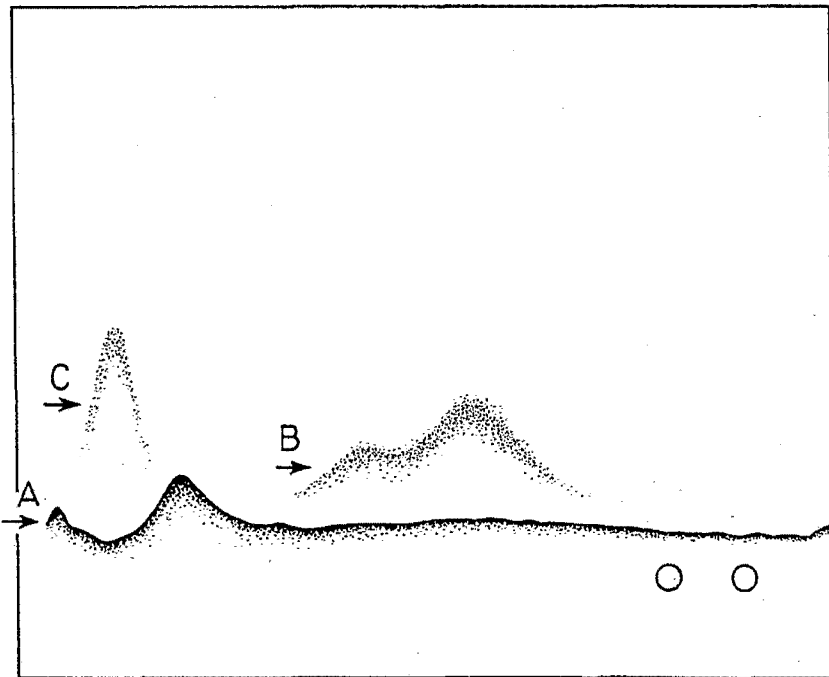


Fig. 6.

Alberto de Eizabunz
Por Poder.

P 70323

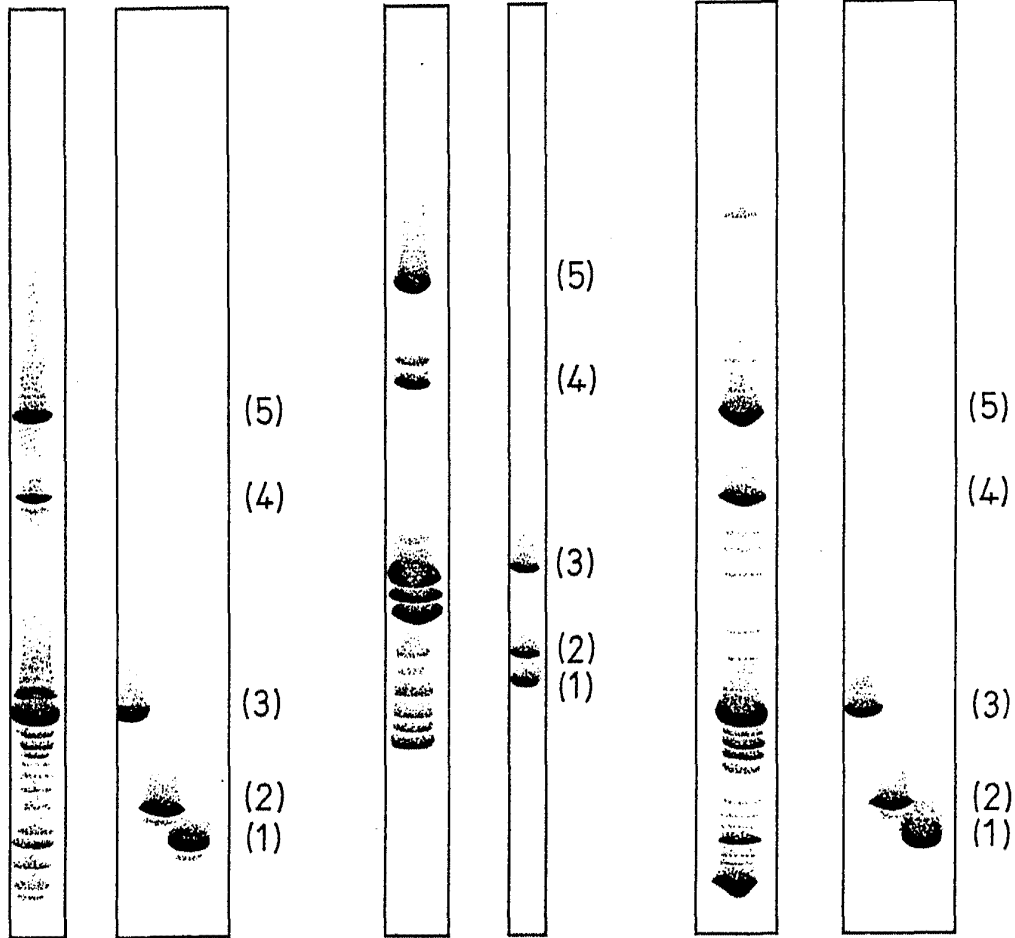


Fig. 7.

Fig. 9.

Fig. 8.

Alberto de Elizabete
for Director

