

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 660**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2005** **E 05729938 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012** **EP 1838731**

54 Título: **Uso de iones ferrosos para incrementar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas**

30 Prioridad:

23.11.2004 BG 10894504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2013

73 Titular/es:

**VASSILEV, TCHAVDAR L. (100.0%)
51 SIMEON RADEV STREET
1618 SOFIA, BG**

72 Inventor/es:

**VASSILEV, TCHAVDAR, L. y
DIMITROV, JORDAN, D.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 660 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de iones ferrosos para incrementar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al uso de iones ferrosos (Fe(II)) para incrementar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas, en particular para incrementar su actividad de fijación a autoantígenos y a antígenos foráneos, su actividad antiidiotípica y sus propiedades antiinflamatorias.

Antecedentes de la invención

- 10 Los anticuerpos naturales de IgG contra autoantígenos y contra antígenos foráneos se sabe que son una parte del repertorio de anticuerpos normales (1, 2). Estos anticuerpos naturales acaban formando parte de preparaciones de inmunoglobulinas terapéuticas (IgIV) para la administración intravenosa que se producen en las mezclas de plasma de donantes sanos. Las preparaciones de IgIV se utilizan para el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias localizadas tanto en un órgano como sistémicas (3). Se ha sugerido que los autoanticuerpos de IgG naturales presentes en la IgIV son responsables de al menos una parte del efecto terapéutico beneficioso observado en los pacientes tratados (4-6).

- 15 Las preparaciones de inmunoglobulinas contienen anticuerpos antiidiotípicos contra idiotipos de autoanticuerpos asociados a la enfermedad y neutralizan a estos últimos (7-9).

- La solicitud de patente internacional PCT/US95/14869 describe un método para enriquecer las preparaciones de inmunoglobulinas con anticuerpos contra los receptores de antígeno de los linfocitos T. Este método se basa en el uso de una fracción de una preparación de inmunoglobulinas obtenida mediante la elución de una columna de 20 inmunoafinidad en la que se ha inmovilizado un péptido sintético del receptor de antígeno mencionado.

- Se ha publicado un método para el tratamiento del lupus eritematoso diseminado en los animales que utiliza una fracción de una preparación con mezcla de inmunoglobulinas enriquecida en anticuerpos contra determinantes idiotípicos de los anticuerpos anti-ADN de los pacientes con lupus. Estos anticuerpos antiidiotípicos se obtuvieron mediante cromatografía de inmunoafinidad de Mg sobre una mezcla inmovilizada de anticuerpos anti-ADN de 25 pacientes con lupus (10).

Se publicó un método para aumentar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas (11) que se basa en el procedimiento siguiente. La solución de inmunoglobulinas se pasa a través de una columna de filtración en gel. Esto da lugar a la elución posterior de las fracciones monoméricas y diméricas. La fracción dimérica obtenida está enriquecida en los autoanticuerpos naturales.

- 30 Dietrich et al. 1992 han publicado un método para enriquecer las preparaciones de inmunoglobulinas con autoanticuerpos naturales y con anticuerpos antiidiotípicos que se basa en el aislamiento de la fracción de inmunoglobulinas que se fija a los fragmentos F(ab')₂ inmovilizados de las IgIV (12).

La solicitud de patente BG108223 describe un método para incrementar la autorreactividad de las soluciones de inmunoglobulinas terapéuticas mediante el tratamiento en un campo magnético estático.

- 35 Sin embargo, el efecto que todos los métodos descritos más arriba tienen sobre la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas es débil.

- La patente europea EP1237928 describe un método para realzar la actividad de una preparación de inmunoglobulinas mediante su tratamiento a pH bajo, a pH alto o con agentes caotrópicos (urea, sales o tiocianatos de guanidina y guanidinio). Sin embargo, todavía no está claro si este tratamiento da lugar a la aparición de nuevas 40 características beneficiosas para la preparación tratada que sean relevantes desde el punto de vista biológico.

- El efecto biológico de los iones ferrosos (Fe(II)) sobre los linfocitos de rata se estudia con experimentos *in vitro* (13). No se encontraron efectos tóxicos, pero la aplicación de este tratamiento a la vez que un campo magnético constante que dio lugar a la muerte de las células. Se sabe que los iones ferrosos pueden potenciar la generación de radicales libres en determinados sistemas biológicos, lo que da lugar a la supresión del crecimiento bacteriano 45 (14).

- La patente de los Estados Unidos US-A-6465511 describe el tratamiento del choque septicémico con un complejo de metal de transición, que incluye metales de transición tales como hierro, cobre, cinc, manganeso, níquel y los atrapadores adecuados. Este complejo de metales de transición puede administrarse solo o con un inhibidor de NO sintetasa y actúa depurando el NO (óxido nítrico) del cuerpo. La invención citada se basa únicamente en el efecto 50 supresor de la concentración del NO y se centra en el tratamiento de la hipotensión en el choque septicémico en el cual un exceso de NO contribuye a la fisiopatología de la afección.

Gracias a Nordström, D et al. (1997) *Rheumatol. Int.* 17: 67-73 se sabe que la complementación de hierro por vía oral se utiliza durante la investigación de la respuesta a la eritropoyetina humana recombinante (r-HuEPO) cuando se está tratando la anemia por enfermedad crónica en los pacientes con artritis reumatoide (AR). El protocolo original para el estudio de la pauta terapéutica incluía monitorizar la respuesta a la r-HuEPO administrada como inyección subcutánea y sólo para los pacientes que eran ferropénicos en combinación con la complementación de hierro por vía oral. Esto último se administra con el objetivo de elevar la concentración de hemoglobina en la sangre del paciente. Los autores no investigan el comportamiento de las citocinas en la respuesta a la EPO, asociada a la AR.

El asunto central de la publicación de de Silva, A. D. et al. (2003) *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD) 9: 316-320 es la comparación retrospectiva del uso, de la tolerancia y de la eficacia del tratamiento con hierro por vía oral en los pacientes con enteropatía inflamatoria y causas no inflamatorias de ferropenia. Se explica que el tratamiento con hierro a menudo se utiliza sin que se haya hecho un diagnóstico formal de ferropenia; en la publicación no se sugiere que se traten las afecciones ocasionadas por la producción incontrolada de citocinas inflamatorias.

Hasta la fecha no se han descrito resultados sobre la capacidad que tienen los iones ferrosos para afectar a la inmunorreactividad y a la actividad antiinflamatoria de las preparaciones de inmunoglobulinas.

Descripción

La presente invención se refiere al uso de iones ferrosos que con el objetivo de incrementar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas, en particular para incrementar su actividad de fijación a antígenos foráneos y a autoantígenos, su actividad antiidiotípica y sus propiedades antiinflamatorias. En concreto, la invención se refiere al uso de un agente para incrementar la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas, en donde el agente representa iones ferrosos (Fe(II)) en forma de una sal ferrosa, y se añade a una dosis única de una preparación de inmunoglobulinas a una concentración final de 0,5 a 2 mM.

La nueva propiedad inesperada de los iones ferrosos de acuerdo con la invención, que aumenta la actividad antiinflamatoria de las preparaciones de inmunoglobulinas, se confirma mediante los resultados de experimentos *in vitro* así como de experimentos *in vivo* (figuras 1-11). Todos los datos obtenidos demuestran que el tratamiento con Fe(II) altera la inmunorreactividad, la actividad antiidiotípica y las propiedades antiinflamatorias de las preparaciones de inmunoglobulinas terapéuticas. Se mostró que el contacto de la preparación con iones de Fe(II) da lugar a un incremento de la fijación a la citocina proinflamatoria hIFN- γ y a un incremento de la supervivencia de los animales con choque séptico.

Para conocer mejor los mecanismos de acción de los iones ferrosos sobre las preparaciones de inmunoglobulinas terapéuticas se realizaron análisis con quimioluminiscencia. La señal fue débil (0,5 mV) en el control de la solución con Mg. Sin embargo, la adición de los iones ferrosos a 0,5 mM incrementó drásticamente la fuerza de la señal (a 20 mV) (figura 11). Esta señal se suprimía en presencia de la superóxido dismutasa, pero no de la catalasa, una observación que indicó que en el sistema se estaban generando aniones superóxido. A través de una serie de reacciones, este radical se convertiría en especies reactivas de oxígeno aún más agresivas (oxígeno singlete y radical hidroxilo) que tienen la capacidad de introducir cambios en las macromoléculas.

Se utilizó la espectrofluorimetría para estudiar las modificaciones estructurales de las moléculas de inmunoglobulinas de resultados del tratamiento con Fe(II). Se observó una disminución en la fuerza de la señal de la fluorescencia y un desplazamiento de los máximos de emisión. Estas observaciones sugieren que se han producido cambios irreversibles que afectan a restos de triptófano que dan lugar a una alteración de la estructura primaria y terciaria de la proteína.

La nueva aplicación para los iones ferrosos, de acuerdo con la invención, tiene la ventaja de que no induce cambios enormes en las moléculas de inmunoglobulina. La capacidad del Mg nativo y del tratado con Fe(II) para fijar el complemento se comparó mediante el método requerido por la Farmacopea Europea (15). No se detectaron diferencias en la actividad anticomplementaria. También se compararon las curvas de la HPLC del Mg nativo y del tratado con iones ferrosos a 0,01, 0,1 y 1 mM. El contenido de moléculas de inmunoglobulina monoméricas, dimericas y poliméricas era parecido (figura 9). Esto muestra que las preparaciones de inmunoglobulinas tratadas de acuerdo con esta invención satisfacen los requisitos para las soluciones de inmunoglobulinas terapéuticas y se podrían administrar por la vía intravenosa.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa el incremento de la fijación a antígenos de *E. coli* que presenta una preparación de inmunoglobulinas tratada con iones de Fe(II) para la administración intravenosa.

En la figura 2 se muestra el incremento de la fijación a antígenos del hígado humano que presenta una preparación de inmunoglobulinas tratada con iones de Fe(II) para la administración intravenosa.

En la figura 3, la IgIV tratada como se menciona en el texto para la figura 1 incrementa su actividad de fijación a la miosina pura.

En la figura 4 se representa el incremento de la fijación a autoantígenos (de un extracto de hígado de ratón) que presenta un anticuerpo monoclonal de ratón tratado con iones de Fe(II).

- 5 En la figura 5 se representan los datos que muestran que el tratamiento con iones de Fe(II) da lugar a la potenciación de las interacciones entre el idiotipo y el antiidiotipo entre las moléculas de inmunoglobulinas.

En la figura 6 se muestra que el tratamiento con iones ferrosos de preparaciones de una IgIV terapéutica incrementa la fijación de ésta última a la citocina inflamatoria hIFN- γ .

- 10 En la figura 7 se representa el incremento de supervivencia de los ratones infectados con 5×10^8 *E. coli* de la cepa WF⁺ y tratados con IgIV tratada con iones de Fe(II).

Figura 8. Efecto de la IgIV tratada con iones ferrosos sobre la proliferación, inducida por PHA, de las células mononucleadas de la sangre periférica humana.

En la figura 9 se muestra la ausencia de agregación de las moléculas de inmunoglobulina después del tratamiento con iones de Fe(II).

- 15 En la figura 10 se representan los indicios de que los cambios estructurales en las moléculas de IgG son resultado de su contacto con los iones ferrosos.

En la figura 11 se muestra que el anión superóxido se genera en una solución de inmunoglobulinas mediante la adición de iones ferrosos.

Ejemplos

- 20 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención sin limitar el alcance ni el espíritu de la misma.

Ejemplo 1: Incremento de la actividad de fijación de las preparaciones de inmunoglobulinas tratadas con iones ferrosos contra antígenos de *E. coli*.

- 25 Se añade sulfato ferroso a una concentración final de 0,01 mM, 0,1 mM o 1 mM a una preparación comercial de inmunoglobulinas para la administración intravenosa (Intraglobin F de Biotest, Alemania) y la mezcla se incuba 12 horas a pH neutro (7,4) a 4 °C.

- 30 Un extracto de antígenos de superficie y periplásmicos de *E. coli* se somete a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y las moléculas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Distintas tiras de la misma membrana se incuban por separado con la preparación de inmunoglobulinas nativa y con la tratada con iones de Fe(II), se lavan, se incuban con un anticuerpo contra la IgG(γ) humana conjugado a la fosfatasa alcalina y se revelan. En la figura 1 se muestra el incremento de la fijación a los antígenos de *E. coli* que presenta la IgIV terapéutica tratada con iones de Fe(II).

Ejemplo 2: Estudio comparativo de la autorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas nativas y tratadas con iones ferrosos.

- 35 Se añadió sulfato ferroso (concentración final a 0,01 mM, 0,1 mM o 1 mM) a Intraglobin F como se describe más arriba en el ejemplo 1.

- 40 El extracto del antígenos del hígado humano se somete a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y las moléculas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Distintas tiras de la misma membrana se incuban por separado con la preparación de inmunoglobulinas nativa y con la tratada con iones de Fe(II) como se describe en el ejemplo 1. En la figura 2 se muestra el incremento de la fijación a los antígenos del hígado humano que presenta la IgIV tratada con los iones de Fe(II), lo que es un signo del incremento de la autorreactividad de la preparación de inmunoglobulinas.

Ejemplo 3: Estudio del efecto del tratamiento de IgIV con iones de Fe(II) sobre su fijación a un autoantígeno puro.

- 45 Este análisis se realiza por ELISA. Las placas de poliestireno para ELISA se recubren con la miosina obtenida de una casa comercial (a 5 μ g/ml en PBS, pH 7,4). Las placas se bloquean y se les añade concentraciones crecientes (de 0,1 a 50 μ g/ml) de las preparaciones nativas y de las tratadas. El incremento de la fijación al autoantígeno puro que presenta la IgIV después de su contacto con los iones de Fe(II) se presenta en la figura 3.

Ejemplo 4: Estudio de los efectos de los iones de Fe(II) sobre un anticuerpo monoclonal.

Se utiliza la estrategia descrita en el ejemplo 3. Se comprueba la reactividad del anticuerpo monoclonal Z2 de ratón (específico de la IgG2a de ratón) frente a los antígenos de hígado de ratón. Los datos muestran un incremento de la autorreactividad (figura 4).

- 5 Ejemplo 5: Estudio de los efectos del tratamiento con iones ferrosos sobre las interacciones del idiotipo con el antiidiotipo entre las moléculas de inmunoglobulinas.

Las placas de ELISA se revisten solo con fragmentos de $F(ab')_2$ de IgIV o solo con fragmentos de Fc de IgIV. La fijación a estos fragmentos inmovilizados que presenta la preparación de inmunoglobulinas sin tratar y tratada con Fe(II) se estudia con el uso de anticuerpos contra la IgG humana (específicos de Fc) o los correspondientes anticuerpos contra la IgG humana (específicos de $F(ab')_2$) conjugados a la fosfatasa alcalina. Los datos muestran (figura 5) que el tratamiento de la preparación de inmunoglobulinas terapéuticas con los iones ferrosos incrementa la fijación al $F(ab')_2$ (panel izquierdo), pero no a los fragmentos de inmunoglobulina Fc γ (panel derecho). Por consiguiente, se produce un incremento de las interacciones entre el idiotipo y el antiidiotipo.

Ejemplo 6: Efecto del tratamiento con iones de Fe(II) sobre la fijación al IFN- γ humano que presentan los autoanticuerpos naturales de IgG humana.

- 15 Se realiza el ELISA con las placas revestidas del IFN- γ humano recombinante como se describe en el texto de la figura 2. El tratamiento con iones ferrosos da lugar a que se incremente la fijación a la citocina proinflamatoria hIFN- γ (figura 6).

Ejemplo 7: Efecto de las IgIV tratadas con Fe(II) sobre la supervivencia de los ratones en choque septicémico.

20 El incremento de la capacidad de fijación a las citocinas proinflamatorias que presenta la preparación de IgIV tratadas con Fe(II) se confirma mediante los resultados de los experimentos *in vivo* con ratones en choque septicémico. A los ratones ICR de 8 a 12 semanas de edad se les inyecta por vía intraperitoneal 5×10^8 *E. coli* (cepa WF+, proporcionada por el Instituto Central de Investigaciones en Medicina Experimental, Jena, Alemania). Se forman tres grupos con 30 animales cada uno. A los ratones del primero se les inyecta PBS (controles), a los del segundo las IgIV nativas, y a los del tercero las IgIV tratadas con iones de Fe(II). Los grupos 2 y 3 se subdividen en grupos con 10 animales cada uno que reciben una única dosis de 5 mg, 1 mg o 0,2 mg de IgIV. Los resultados del estudio muestran que, 24 horas después de la infección, el 60-65% de los animales que recibieron PBS y las IgIV nativas están muertos, mientras que sobreviven todos los ratones tratados con las IgIV tratadas con los iones de Fe(II) (figura 7).

- 30 Ejemplo 8: Estudio de la capacidad de supresión de la proliferación celular que tiene la preparación de inmunoglobulinas tratada con Fe(II).

Se obtuvieron células mononucleadas de la sangre periférica a partir de la sangre venosa donada por un voluntario sano. Las células se cultivan *in vitro* en presencia del mitógeno PHA (16). Seis horas después se añaden cantidades crecientes de una preparación de IgIV nativas y otra tratada con Fe(II) (a unas concentraciones finales de 20 μ g, 200 μ g, 400 μ g, 1000 μ g o 2000 μ g por mililitro). Los resultados apuntan a que la preparación de la mezcla de IgG terapéuticas tratadas con iones ferrosos tiene una mayor capacidad inhibidora de la proliferación celular inducida por mitógenos (figura 8).

Ejemplo 9: Estudio de la formación de agregados moleculares después del tratamiento de una preparación de IgIV terapéuticas con iones ferrosos.

40 Se añaden iones ferrosos a 0,01, 0,1 y 1 mM a una preparación de inmunoglobulinas y ésta última se somete al análisis por HPLC con una columna de gel TSK G3000 SW (7,5 mm x 60,0 cm) y una columna de gel TSK SW Guard protectora (7,5 mm x 7,5 cm). Se presenta el porcentaje de los agregados/dímeros/monómeros de inmunoglobulina. El análisis comparativo de las curvas cromatográficas no muestra ninguna formación de agregados adicional significativa después del tratamiento de la preparación con iones ferrosos (figura 9).

- 45 Ejemplo 10: Análisis de los cambios estructurales de las moléculas de inmunoglobulina tras el tratamiento con los iones ferrosos.

Se observa un cambio de la fluorescencia del triptófano después de la incubación de un anticuerpo monoclonal con iones de Fe(II) a 1 mM. El análisis se realiza a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro de Perkin-Elmer a una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se recoge el espectro de emisión de 300 a 400 nm. Se detecta una disminución en la intensidad de la señal de fluorescencia y un desplazamiento en la emisión máxima. Son signos de los cambios estructurales en la molécula.

El desplazamiento del máximo de emisión puede ser el resultado de la oxidación del triptófano a kinurena. Esta hipótesis está apoyada por el análisis de quimioluminiscencia con lucigenina. Se añade IgIV (10 mg/ml) a un tampón que contiene lucigenina a 0,5 mg/ml. Se detecta una señal quimioluminiscente débil. La adición de iones ferrosos a

0,5 mM al mismo sistema da lugar a la generación de una señal fuerte. Esta señal no está influida por la adición de 10 U de catalasa, pero desaparece en presencia de 1 U de superóxido dismutasa. Por lo tanto, los iones ferrosos son responsables de la generación de los radicales de los aniones superóxido que afectan a la molécula de la proteína (figuras 10 y 11).

Referencias

1. Coutinho, A., M. D. Kazatchkine, and S. Avrameas. 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7:812.
2. Notkins, A. L. 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 25:174.
3. Kazatchkine, M. D., and S. V. Kaveri. 2001. Immunomodulation of Autoimmune and Inflammatory Diseases with Intravenous Immune Globulin. *N Engl J Med* 345:747.
4. Vassilev, T. L., M. D. Kazatchkine, J. -P. D. Van Huen, M. Mekrache, E. Bonnin, J. -C. Mani, C. Lecroubier, D. Korinth, D. Baruch, F. Schriever, and S. K. Kaveri. 1999. Inhibition of cell adhesion by antibodies to Arg-Gly-Asp (RGD) in normal immunoglobulin for therapeutic use (intravenous immunoglobulin, IVIg). *Blood* 93:3624.
5. Kaveri, S., T. Vassilev, V. Hurez, R. Lengagne, C. Lefranc, S. Cot, P. Pouletty, D. Glotz, and M. D. Kazatchkine. 1996. Antibodies to a conserved region of HLA class I molecules, capable of modulating CD8 T cell-mediated function, are present in pooled normal immunoglobulin for therapeutic use. *J CHN Invest* 97:865.
6. Marchalonis, J. J., H. Kaymaz, and F. e. a. Dedeoglu. 1992. Human autoantibodies reactive with synthetic autoantigens from T-cell receptor betha chain. *Proc. Natl. Acad. ScL USA* 89:3325.
7. Rossi, F., and M. D. Kazatchkine. 1989. Antiidiotypes against autoantibodies in pooled normal human polyspecific Ig. *J. Immunol.* 143:4104.
8. Rossi, F., Y. Sultan, and M. D. Kazatchkine. 1988. Anti-idiotypes against autoantibodies and alloantibodies to Factor VIII:C (anti-haemophilic factor) are present in therapeutic polyspecific normal immunoglobulins. *Clin. Exp. Immunol.* 74:311.
9. Kazatchkine, M. D., G. Dietrich, V. Hurez, N. Ronda, B. Bellon, F. Rossi, and S. V. Kaveri. 1994. V region-mediated selection of autoreactive repertoires by intravenous immunoglobulin (i.v.Ig). *Immunol Rev* 139:79.
10. Shoenfeld, Y., L. Rauova, B. Gilburd, F. Kvapil, I. Goldberg, J. Kopolovic, J. Rovensky, and M. Blank. 2002. Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus. *International Immunology* 14:1303.
11. Vassilev, T. L., I. L. Bineva, G. Dietrich, S. V. Kaveri, and M. D. Kazatchkine. 1995. Variable region-connected, dimeric fraction of intravenous immunoglobulin enriched in natural autoantibodies. *J AUTOIMMUN. Journal of Autoimmunity* 8:405.
12. Dietrich, G., S. V. Kaveri, and M. D. Kazatchkine. 1992. A V region- connected autoreactive subfraction of normal human serum immunoglobulin G. *Eur J Immunol* 22:1701.
13. Jaite, J., J. Grzegorzczuk, M. Zmyslony, E. Rajkowska, M. Sliwinska- Kowalska, and M. Kowalski. 2001. Influence of a 7 mT Static Magnetic and Iron Ions on Apoptosis and Necrosis in Rat Blood Lymphocytes. *Journal Occup Health* 43:379.
14. Klebanoff, S. J., A. M. Waltersdorph, B. R. Michel, and H. Rosen. 1989. Oxygen-based Free Radical Generation by Ferrous Ions and Deferoxamine. *The Journal of Biological Chemistry* 264:19765.
15. 1997. Monograph 918. In: European Pharmacopoeia. Maisonneuve, Moulins-Les-Metz, France.
16. van Schaik, I. N., I. Lundkvist, M. Vermeulen, and A. Brand. 1992. Polyvalent immunoglobulin for intravenous use interferes with cell proliferation in vitro. *J CHN Immunol* 12:325.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de iones ferrosos para incrementar *in vitro* la inmunorreactividad de las preparaciones de inmunoglobulinas.
2. Utilización de iones ferrosos de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que se añade una única dosis de iones ferrosos a una preparación de inmunoglobulinas a una concentración final de 0,5 a 2,0 mM.
3. Utilización de una preparación de inmunoglobulinas con la inmunorreactividad incrementada, que se puede obtener de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para la fabricación de un medicamento para tratar el choque séptico.

10

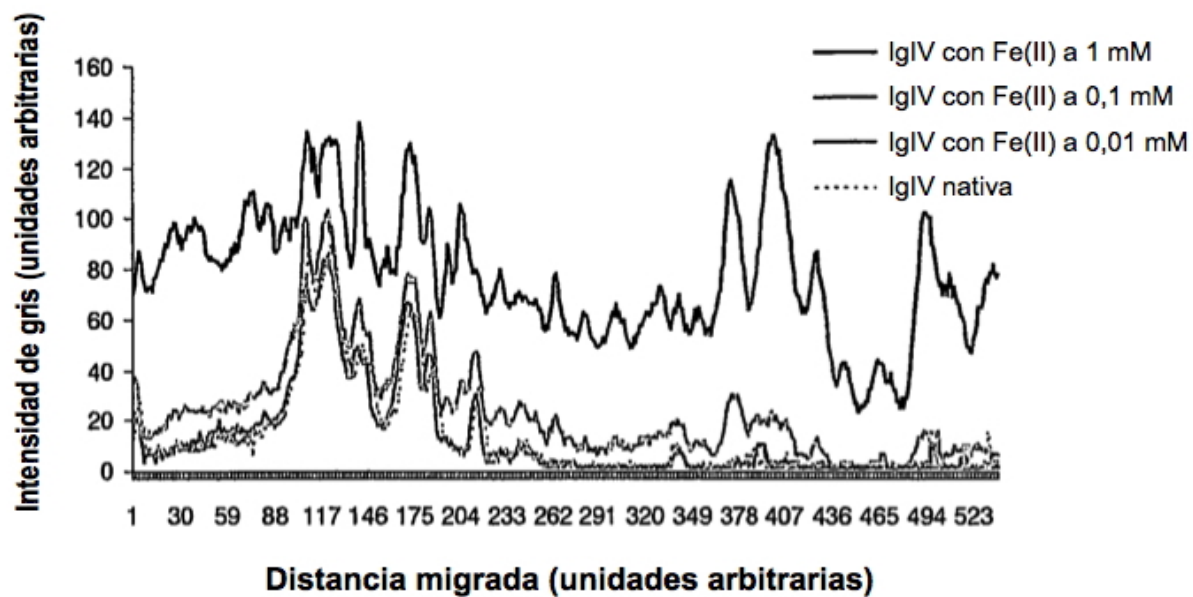


FIGURA 1

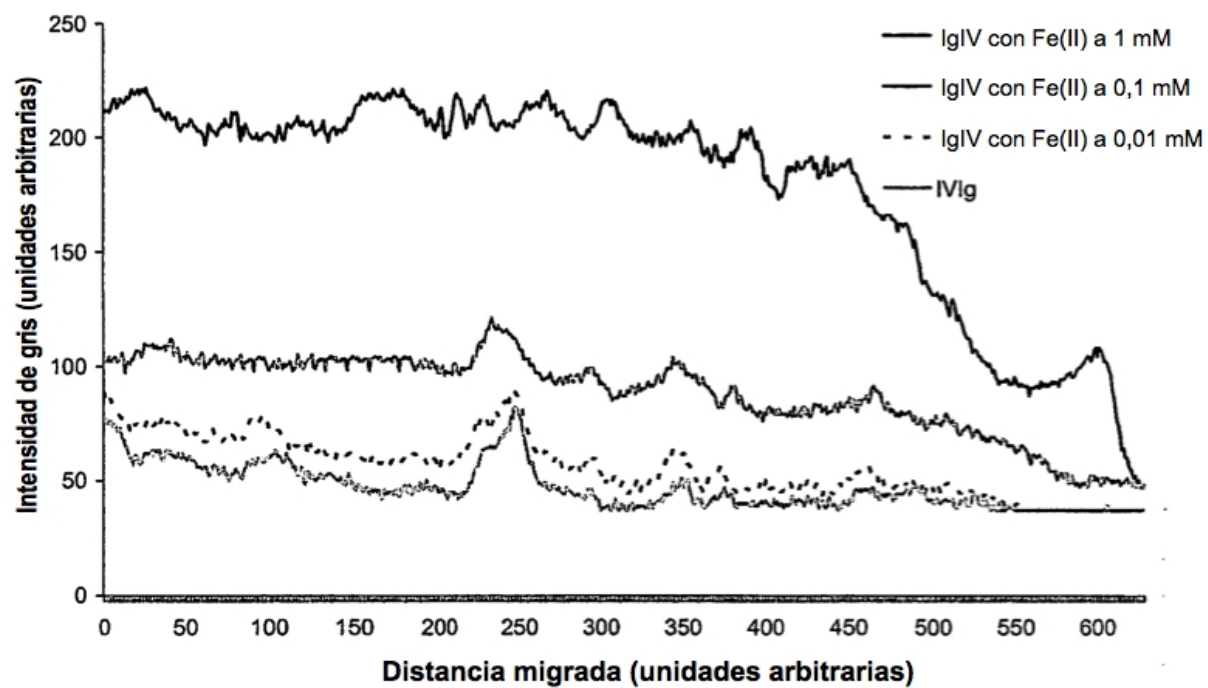
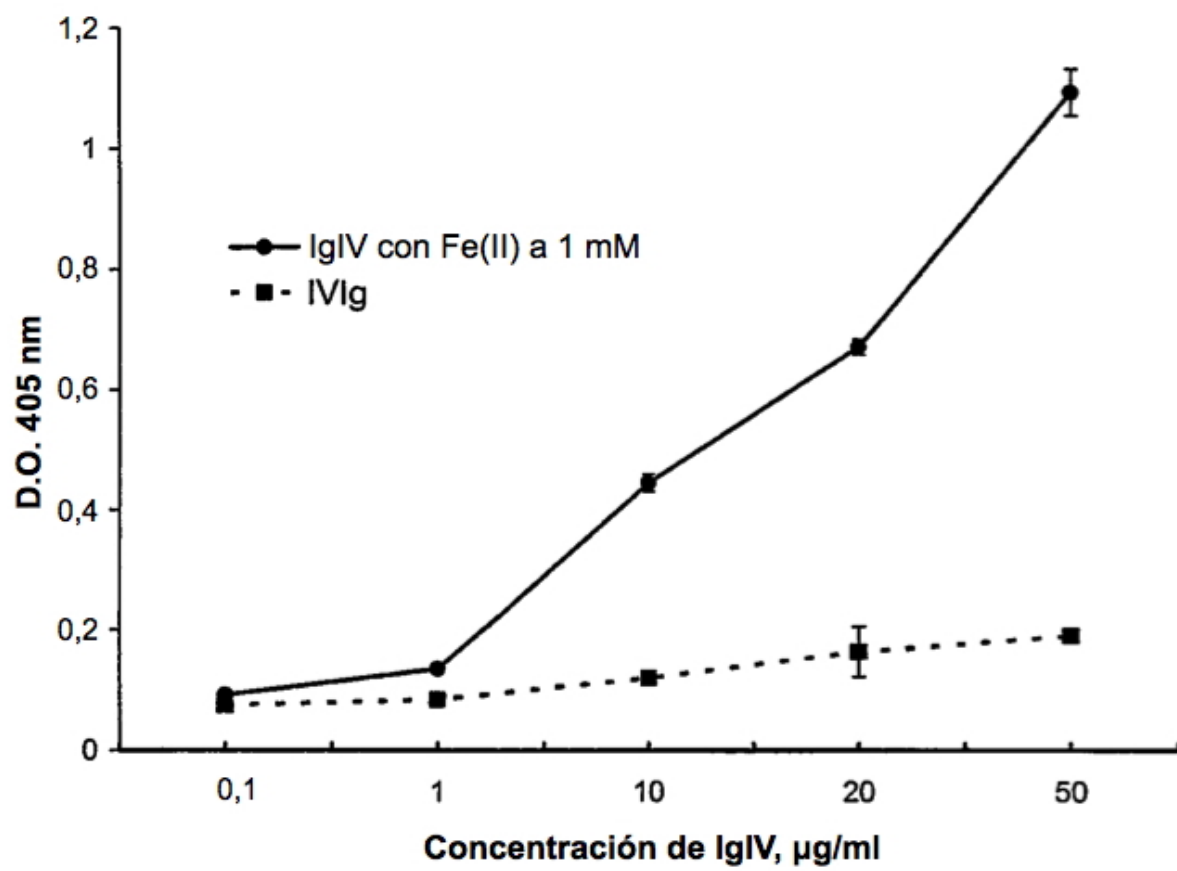


FIGURA 2

**FIGURA 3**

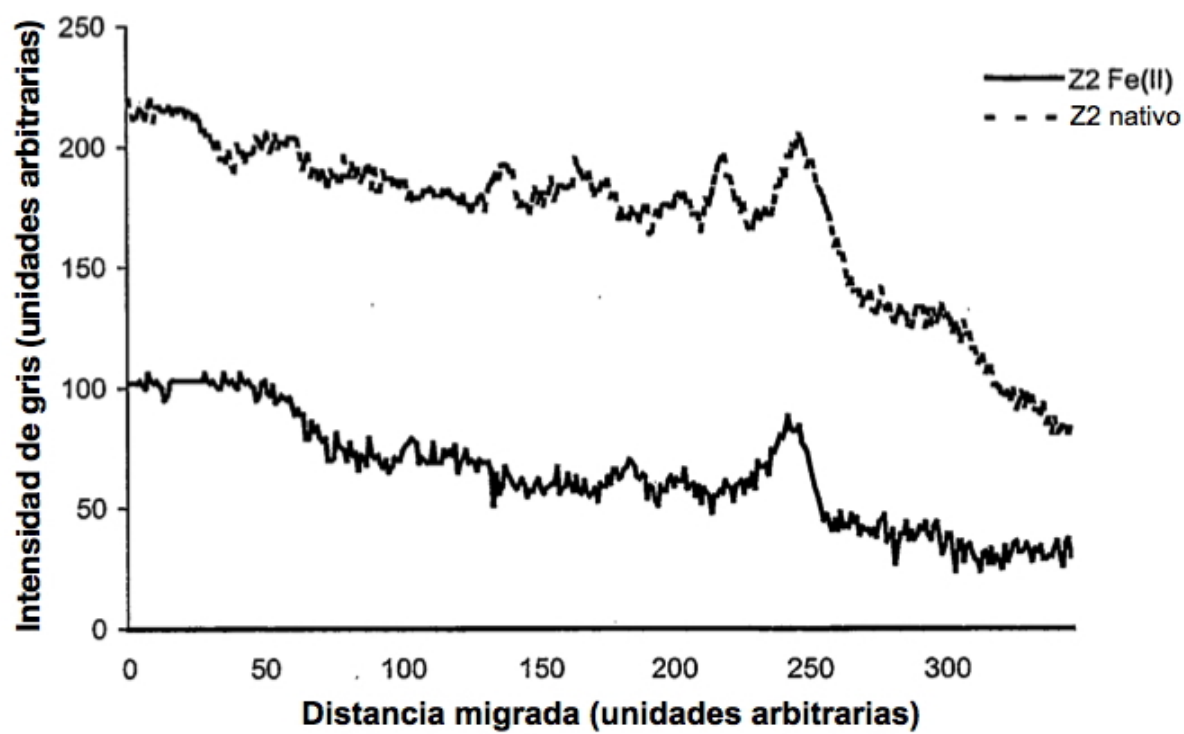


FIGURA 4

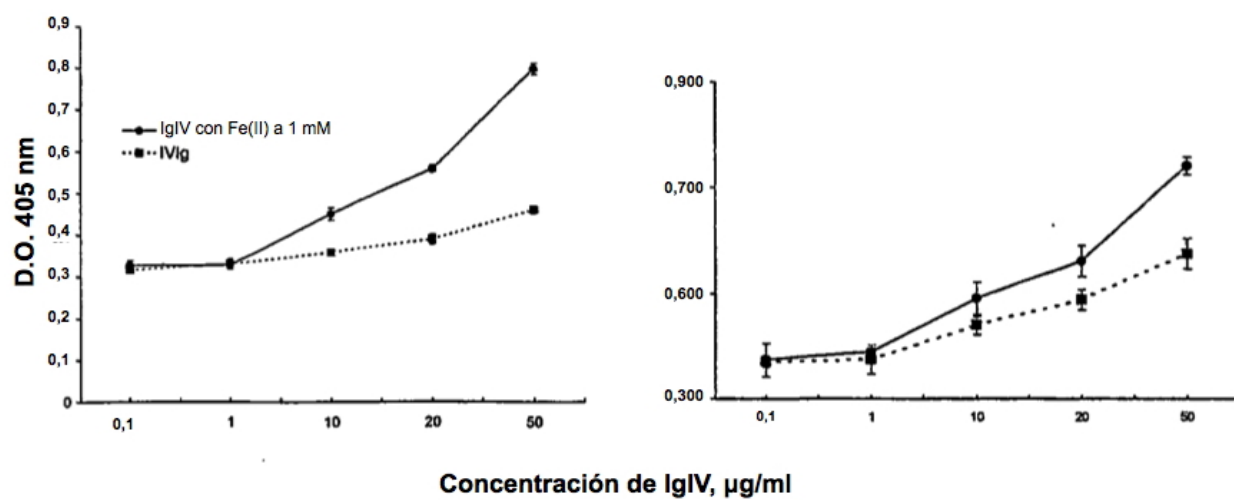


FIGURA 5

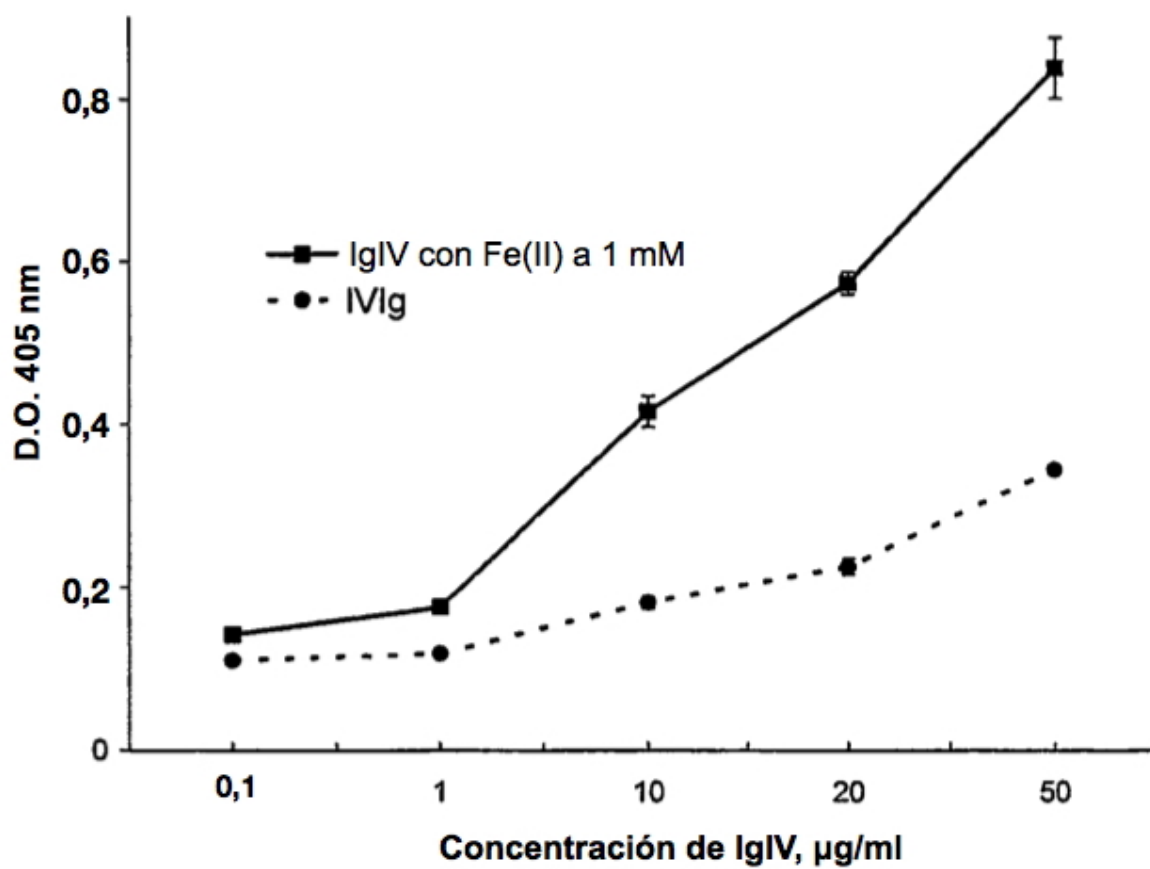


FIGURA 6

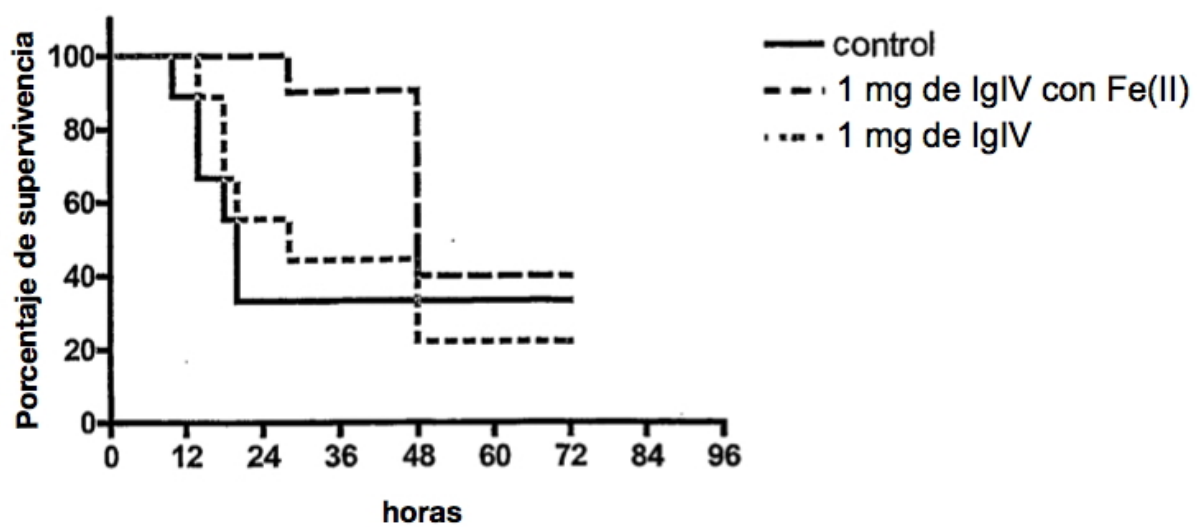


FIGURA 7

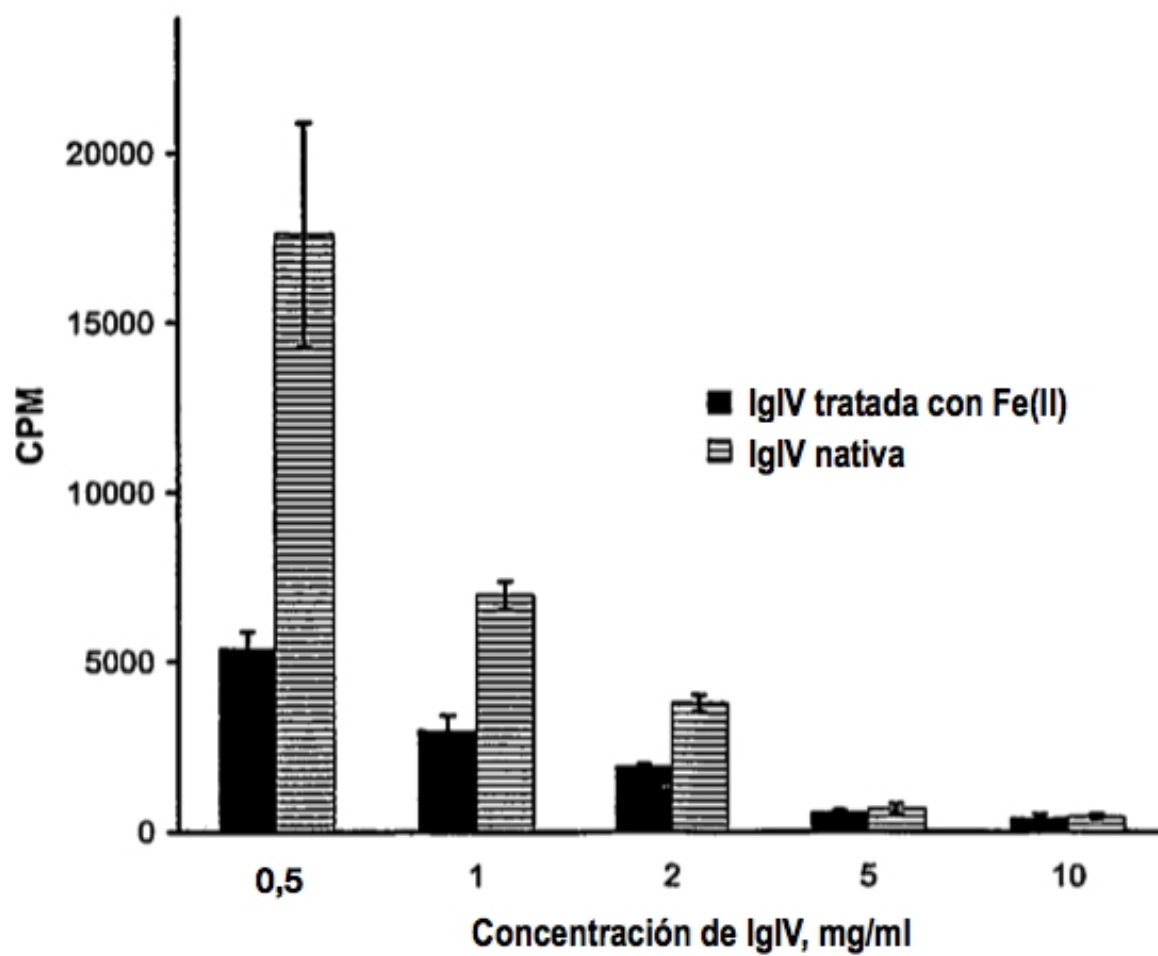


FIGURA 8

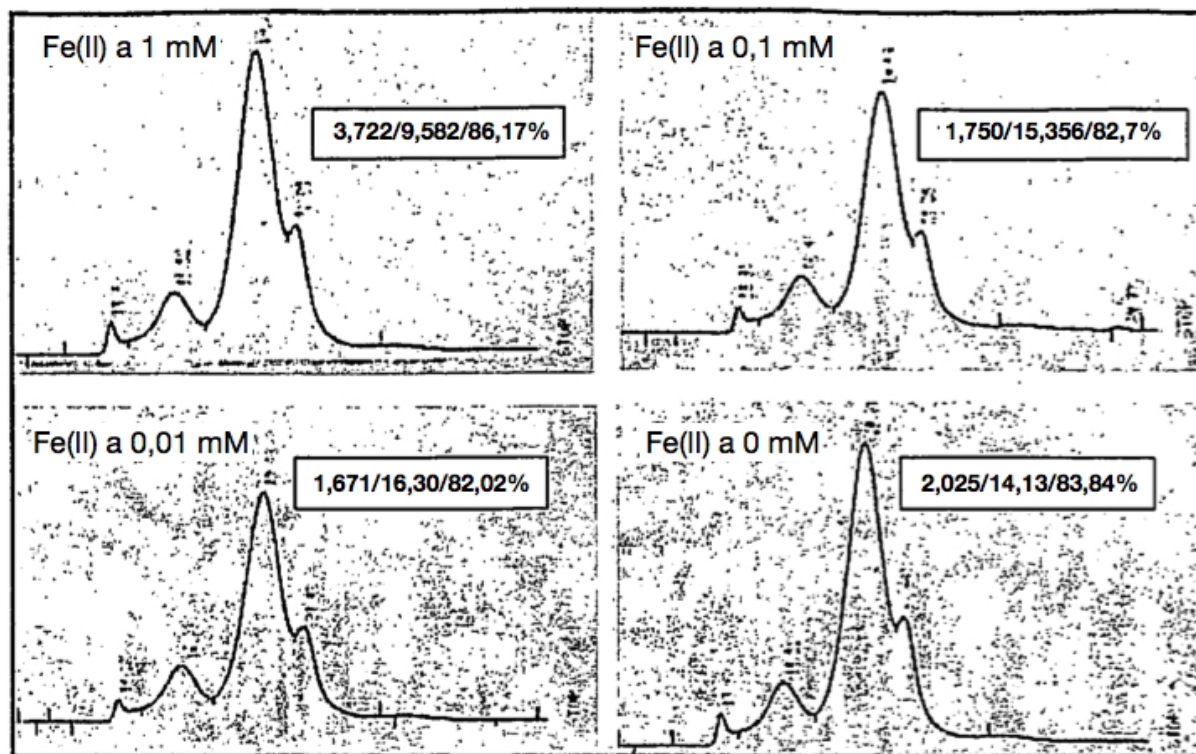


FIGURA 9

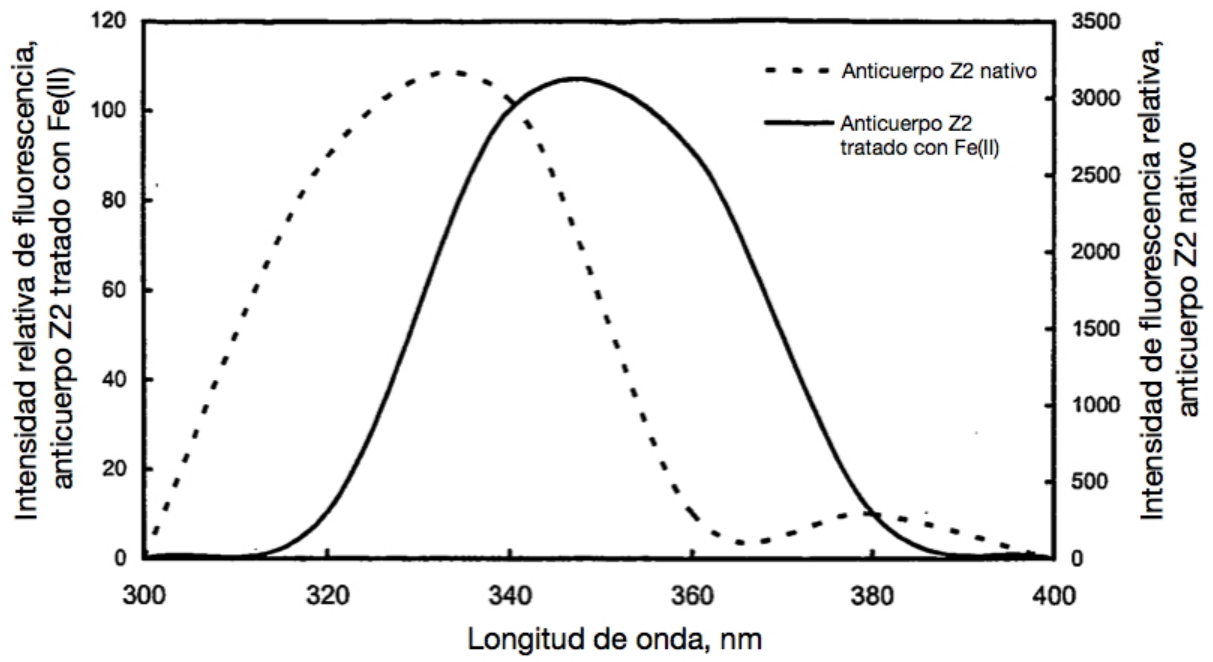
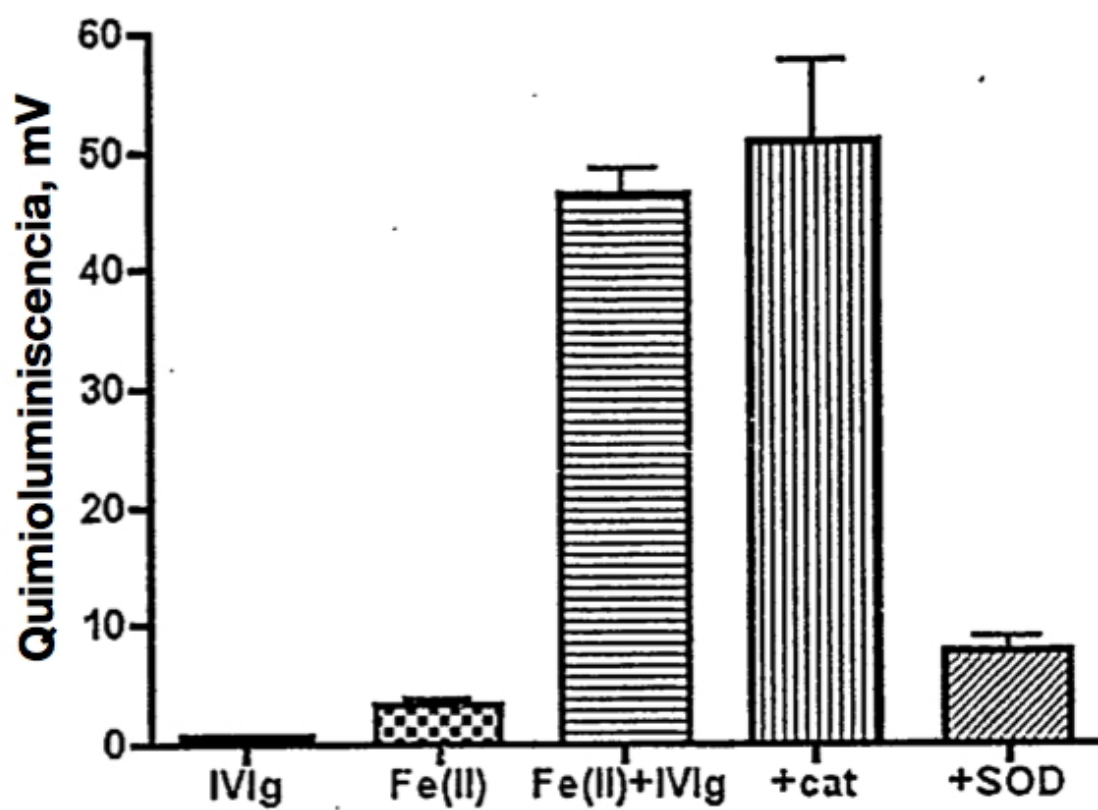


FIGURA 10

**FIGURA 11**