

12 SEP 1969



304015

304015

PATENTE DE INTRODUCCION

por DIEZ años

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

D. JAIME FERRE FERRERES

de nacionalidad española, con domicilio
en Barcelona, PO Exposición, núm. 62,
relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FRACCIO-
NES GLOBULINICAS A PARTIR DEL PLASMA HUMANO"

=====



02 SEP

304015

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Introducción se contrae, conforme se indica en su enunciado, a un procedimiento para la obtención de fracciones globulínicas a partir del plasma

5. humano, tanto normal citratado, como procedente de dadores hiperinmunizados activamente. - - - - -

Dentro del complejo proteínico existente en el plasma humano, la globulina gamma presenta especial interés dado que es la proteína que contiene los anticuerpos o defensas naturales del organismo, y de ahí que se haya intentado desde hace muchos años su obtención en estado de pureza y de conservación suficientes para uso terapéutico. - - - - -

10.

Los primeros métodos de separación de globulina gamma del plasma humano se basaban en la precipitación salina con sales como el sulfato amónico, sulfato sódico, sulfito sódico, etc. obteniéndose un producto con gran proporción de sales cuya separación era muy compleja. - - - - -

15.

Aumentadas las necesidades de globulina gamma y de otras fracciones plasmáticas durante la segunda guerra mundial, se intensificaron las investigaciones para desarrollar un procedimiento fácil, seguro y aplicable en gran escala, llegándose a un método de fraccionamiento del plasma que se basa en el control riguroso de cinco variables: concentra-

20.

304015^{2 SCP}

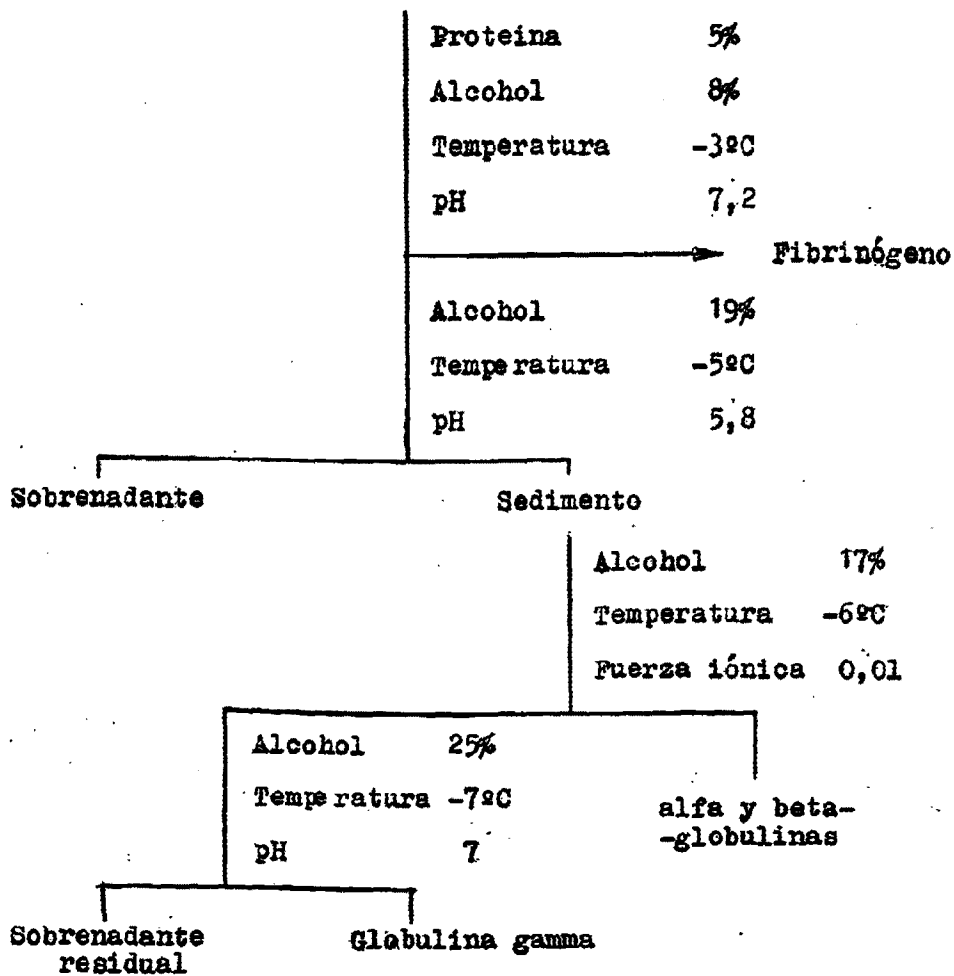


ción de proteína, concentración de alcohol, temperatura, pH y concentración salina. Modificando los valores de estas variables se logra dividir las proteínas del plasma en cinco fracciones bien definidas. - - - - -

- 5. De acuerdo con estas premisas se ha llevado a cabo el procedimiento objeto de la presente Patente, el cual, esencialmente, se caracteriza por el hecho de que la masa de plasma humano, con una concentración de proteína del 5% y a 0°C, se trata con alcohol del 95% hasta alcanzar una
- 10. concentración del 8%, a un pH 7,2, al tiempo que se baja la temperatura gradualmente hasta -3°C, con lo que se obtiene un precipitado de fibrinógeno, que se separa, mientras que el producto sobrenadante se le aumenta su concentración de alcohol hasta 19% a un pH 5,8, bajándose la temperatura a
- 15. -5°C, de cuya mezcla se obtiene un sedimento que, suspendido en agua y soluciones tampón adecuadas a 0°C, se trata con alcohol hasta alcanzar una concentración del 17% a un pH 5,1, y con fuerza o concentración iónica 0,01, bajándose la temperatura a -6°C, con lo que se obtiene una fracción
- 20. sobrenadante de alfa y beta-globulina y un resto del que precipita la gamma-globulina por tratamiento con alcohol hasta concentración del 25% a un pH 7 y bajando la temperatura hasta -7°C. - - - - -

- 25. Para facilitar la comprensión de las ideas expuestas, se describe seguidamente un esquema del procedimiento de obtención y un ejemplo ilustrativo del mismo. - - - - -

304015 2 SEP
Plasma



Una forma operativa a seguir, según el esquema precedente, es la que se describe en el ejemplo que sigue:

5. A 10 litros de plasma humano, con una concentración de proteína del 5% y a 0°C, se le va añadiendo alcohol del 95% hasta alcanzar una concentración del 8% a pH 7,2, al tiempo que la temperatura se disminuye gradualmente hasta -3°C, con lo que se obtiene un precipitado, constituido por fibrinógeno, que se separa por centrifugación. - - - - -

El sobrenadante se ajusta a pH comprendido entre



304015

5,8 y 5,9, con tampón acetado de pH 4 de la siguiente composición. - - - - -

- Solución de acetato sódico 4 M 200 cc.
- Solución de ácido acético 10 M 400 cc.
- 5. Agua 400 cc.

Seguidamente se añade alcohol del 95% hasta alcanzar una concentración del 19%, al tiempo que la temperatura se baja gradualmente hasta -5°C. La mezcla se deja en agitación de 12 a 16 horas y el sedimento se separa mediante centrifugación. - - - - -

10.

Cada kilo del precedente sedimento, en pasta húmeda centrifugada, se suspende en 10 litros de agua a 0°C. A esta suspensión se le añade lentamente una mezcla de 680 cc. de ortofosfato bisódico (PO_4HNa_2) 0,05 M y 4170 cc. de ácido acético 0,05 M con lo que el pH de la suspensión se sitúa a $4,80 \pm 0,05$. - - - - -

15.

Después de 2 ó 3 horas de agitación a 0°C se cambia el pH a $5,1 \pm 0,04$, añadiendo una mezcla de 2640 cc. de ortofosfato bisódico 0,05 M y 2260 cc. de ácido acético 0,05M, la mezcla se diluye con 9,7 litros de agua a 0°C y la concentración de alcohol se aumenta hasta el 17%, añadiendo alcohol del 95%. Al propio tiempo que se añade el alcohol se va disminuyendo progresivamente la temperatura hasta alcanzar -6,5°C. - - - - -

20.

25.

Después de una hora de agitación, se centrifuga la mezcla y el sobrenadante se clarifica mediante filtración.

La globulina gamma de la solución se precipita ajus-

304015^{12 SEP}



tando el pH a 6,8 - 7,2 con hidróxido sódico 0,1N y aumentando la concentración de alcohol hasta el 25%. Este precipitado se separa mediante centrifugación y se seca por liofilización. - - - - -

5. Finalmente se procede a la determinación del título en anticuerpos por las técnicas habituales de aglutinación, fijación del complemento o neutralización del efecto citopatógeno de los virus, según el caso. - - - - -

10. Describas suficientemente las características de la presente Patente, debe hacerse constar, en resumen, que en la misma podrán introducirse cuantas variantes de detalle la experiencia y la práctica puedan aconsejar, siempre que con ello no se desvirtúe su esencialidad, que es la que se concreta en la reivindicación primera, ya sea considerada
15. aisladamente, ya sea junto con una o varias de las reivindicaciones restantes en sus combinaciones técnicamente posibles. - - - - -

N O T A

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

R E I V I N D I C A C I O N E S

25. 1.- Procedimiento para la obtención de fracciones globulínicas a partir del plasma humano, tanto el normal citratado como el procedente de dadores hiperinmunizados activamente, caracterizado por el hecho de que la masa de plasma humano, con una concentración de proteína del 5% y a 0°C, se trata con alcohol del 95% hasta alcanzar una concentración

304015



del 8%, a un pH 7,2, al tiempo que se baja la temperatura gradualmente hasta -3°C , con lo que se obtiene un precipitado de fibrinógeno, que se separa, mientras que al producto sobrenadante se le aumenta su concentración de alcohol hasta 19% a un pH 5,8, bajándose la temperatura a -5°C , de cuya mezcla se obtiene un sedimento que, suspendido en agua y soluciones tampón adecuadas a 0°C , se trata con alcohol hasta alcanzar una concentración del 17% a un pH 5,1, y una fuerza o concentración iónica 0,01, bajándose la temperatura a -6°C , con lo que se obtiene una fracción sobrenadante de alfa y beta-globulina y un resto del que precipita la gamma-globulina, que se desea obtener, por tratamiento con alcohol hasta concentración del 25% a un pH 7 y bajando la temperatura hasta -7°C . - - - - -

15. 2.- Procedimiento para la obtención de fracciones globulínicas a partir del plasma humano, según la anterior reivindicación, caracterizado por el hecho de que el ajuste del pH desde 7,2 hasta 5,8 se lleva a cabo mediante tampón acetado de pH 4, compuesto por solución de acetato sódico 4 M, solución de ácido acético 10 M y agua, en las proporciones volumétricas de 1,2 y 2 respectivamente. - - - - -

25. 3.- Procedimiento para la obtención de fracciones globulínicas a partir del plasma humano, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el pH del sedimento se ajusta desde el valor 5,8 hasta $5,10 \pm 0,04$ mediante una mezcla de ortofosfato bisódico 0,05 M y ácido acético 0,05 M, pasando previamente por un estado mayormente ácido de valor $4,80 \pm 0,05$ ajustado con otra mezcla de los mismos productos en proporción adecuada. - - - - -



304015

4.- Procedimiento para la obtención de fracciones globulínicas a partir de plasma humano, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el pH de la solución que contiene la globulina gamma, se ajusta desde el valor 5,1 \pm 0,04 hasta un valor comprendido entre 6,8 y 7,2 mediante sosa cáustica 0,1 N. - - - - -

5.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FRACCIONES GLOBULINICAS A PARTIR DEL PLASMA HUMANO". - - - - -

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

MADRID, 12 SET. 1964
[Handwritten signature]