

374539

PATENTE DE INVENCION

Caso Nº 23.441

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION C.  
CLASE A-61  
SUBCLASE K

## Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PROTEINAS  
LIOFILIZADAS DE ANIMALES HOMOTERMOS.

---

*Solicitante:* AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, residente en Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

---

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de proteínas liofilizadas de animales homotermos. De un modo más particular, el invento se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto fácilmente hidrosoluble y que, por lo tan-



374539

to, se reconstituye rápidamente en una solución acuosa.

Las proteínas del invento comprenden, por ejemplo, globulina alfa, globulina beta, globulina gamma y albúmina. De todas estas proteínas, probablemente la más estudiada sea la globulina gamma. La globulina gamma humana se vende normalmente en forma de una solución como un preparado concentrado estéril que contiene aproximadamente un 16 por ciento de globulina gamma en un diluyente de una solución 0,3 molar de glicina, que contiene como preservativo 1:10.000 de mertiolato sódico. Este producto exige refrigeración para poder mantener su estabilidad.

5.

10.

15.

20.

Como no se dispone universalmente de refrigeración, existe una demanda definida de una forma estable deshidratada de globulina gamma. Dicho preparado se encuentra disponible, pero los preparados de globulina gamma de origen placentario deshidratada de una solución concentrada (8-16 %) han demostrado poseer una proporción extremadamente lenta de solubilidad cuando se reconstituyen.

25.

Se ha descubierto ahora que la adición de agentes tensioactivos elegidos a la proteína líquida antes de la liofilización, da por resultado un producto deshidratado estable, que se puede reconstituir en cuestión de menos de diez minutos. Aunque para la práctica de este invento no es un factor crítico la cantidad de agente tensioactivo, la cantidad preferida es la comprendida entre un 0,07 % y un 1,5 %, basado en el peso de la proteína.

30.

La materia prima para este procedimiento

374539

130



to se puede preparar mediante una variedad de modificaciones del método básico que sigue:

5. Se muele una parte de la placenta entera, se extraen las globulinas en una solución salina que se somete después a una serie de fraccionaciones con alcohol, dando por resultado finalmente una globulina gamma liofilizada, que se reconstituye en solución de glicina acuosa que contiene preservativos.

10. En la patente estadounidense 3.449.316 se pueden encontrar otros métodos para la preparación de la materia prima.

15. Según el presente invento, se deposita globulina de suero inmune en una concentración del 8 % al 16 % en solución acuosa (agua pirogenada o una solución salina apropiada) que contiene preservativos, en un recipiente estéril exento de pirógenos y se mezcla aproximadamente con la mitad de un volumen equivalente de solución estéril compuesta por una décima parte aproximadamente de un volumen equivalente de agente tensioactivo como es el Pluronic Polyol<sup>®</sup> F68 (Wyandotte Chemical Company) y otra mitad de un volumen equivalente de agua exenta de pirógenos.

20. Se llenan frascos pequeños exentos de pirógenos, y de una forma aséptica, con esta solución y después se congelan mediante inmersión parcial en un baño de alcohol inferior-hielo seco (anhídrido carbónico sólido).

25. Los frasquitos llenos se deshidratan después al vacío. Después de la operación de deshidratación se cierran los frasquitos con tapones estériles

30.

13 DI



374539

y se precintan.

5. Además de la presencia de agentes tensioactivos, es crítico que la solución se congele rápidamente en los frasquitos por inmersión en un baño de alcohol inferior-hielo seco en lugar de congelarlos lentamente en una cámara congeladora.

10. Cada frasquito de globulina de suero inmune así producido se vende con un segundo frasquito que contiene una solución estéril de diluyente. Cuando se va a utilizar, el diluyente se saca de su frasquito y se deposita en el frasquito que contiene la pastilla seca de ISG. Una ligera operación de mezcla produce la disolución completa en un periodo de 0 a 10 minutos. Si la globulina gamma se ha deshidratado de una solución salina o de glicina, el diluyente de elección sería agua.

15. Si se deshidrata de agua, se utilizaría una solución salina fisiológica o glicina 0,3 M.

Los agentes tensioactivos aplicables a este procedimiento comprenden, por ejemplo:

20. Pluronic<sup>®</sup> Polyol F68 (Wyandotte Chemical Company). Una base hidrófoba que tiene grupos hidrófilos en ambos extremos de la molécula, un promedio de peso molecular de 8.350 y un punto de fusión de 10,0°C (Indice de Merck, 1968 P. 846). Tween<sup>®</sup> 80,

25. (Polysorbate 80 (Polioxietileno (20) sorbitan monooleato)). Una mezcla compleja de éteres de polioxietileno de ésteres oléicos parciales mezclados de anhídrido de sorbitol. (Indice de Merck, 1968 P. 848).

30. Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar adicionalmente este invento.

374539



EJEMPLO 1

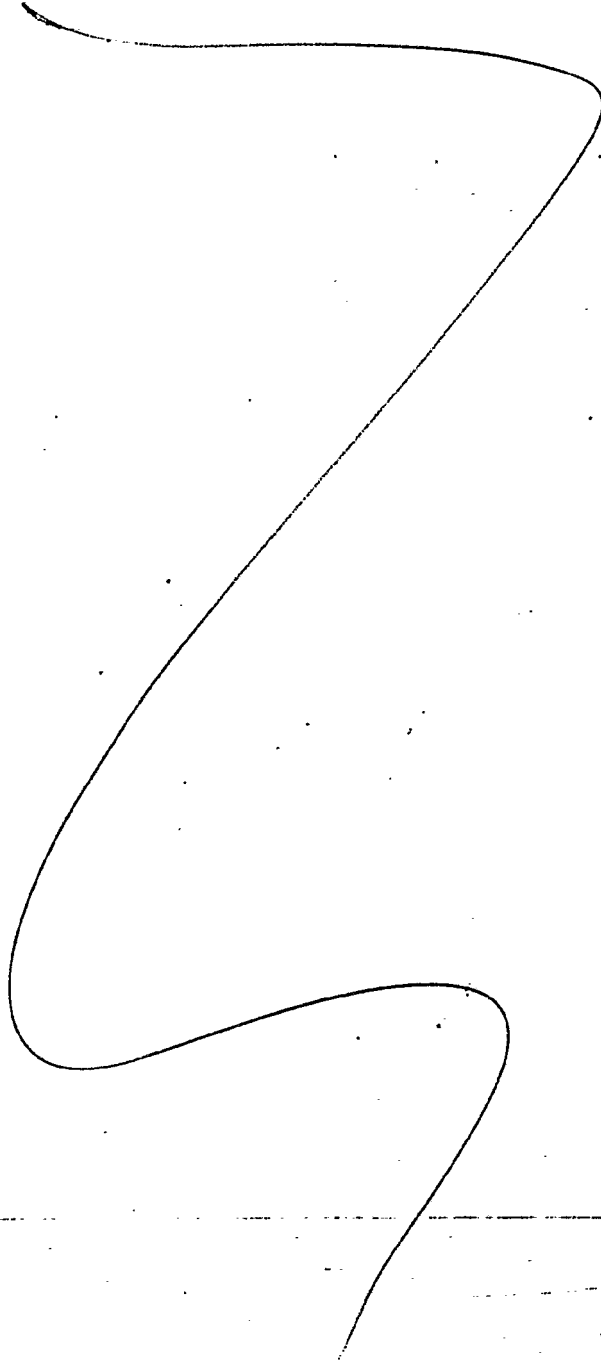
Efecto de la Adición de Tween<sup>®</sup> 80 y Polyol<sup>®</sup> F68 Durante la Liofilización en la Reconstitución de Globulina de Suero Inmune.

5. Se preparó una suspensión en agua de globulina de suero inmune (ISG) y se dejó reposar a 2°C durante 16 horas. Se separó por decantación un precipitado insoluble y se liofilizó el sobrenadante. Se reconstituyó el polvo seco a una solución al 16 %. Esta solución madre o solución concentrada se diluyó hasta alcanzar una solución al 8 % con agua. Se añadieron diversas cantidades del 1 % y del 2 % de Tween<sup>®</sup> 80 y Polyol<sup>®</sup> F68 a partes de la solución de ISG al 8 % y se liofilizaron estas partes. Uno de cada par de frascos en cada uno de los niveles de concentración de agente tensioactivo se llenó al vacío. El diluyente para reconstitución fué de 5,0 cc. de solución salina al 0,85 % a un pH de aproximadamente 7,0. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla I.
- 10.
- 15.
20. Lo expuesto indica que, cuando se deshidrata desde agua, la concentración óptima de Tween<sup>®</sup> 80 antes de la liofilización era de aproximadamente un 0,14 % (1 cc. de Tween<sup>®</sup> 80 al 1 % añadido a 6,0 cc. de globulina de suero inmune al 8 %). La concentración óptima de Polyol<sup>®</sup> F68 antes de la liofilización parece ser del 0,28 % o superior. Los frascos donde se había practicado el vacío se reconstituían más rápidamente que los frascos donde no se había hecho el vacío.
- 25.
30. Todas las soluciones eran transparentes, formándose una ligera turbidez a los niveles inferiores de agente ten-

374539



sioactivo. La reconstitución en solución salina hiper-  
tónica (1 %) resultó más lenta.





- 7 -

T A B L A I  
=====

Centímetros cúbicos de Tween (R) 80 al 1 %	Centímetros cúbicos de Polyoil (R) F68 al 1 %	Tiempo para la disolución en minutos.	
		Con vacfo	Sin vacfo
1,0		7	8
0,8	1,0	10	13
0,6	0,8	10	11
0,4	0,6	12	35
0,2	0,4	10	16
0,1	0,2	32	77
0,05	0,1	23	28
0,0 (Contrastación)	0,0 (Contrastación)	45	90
		30	32
		210	210
		42	49
		210	210
		100	100
		210	210
		210	210

T A B L A I

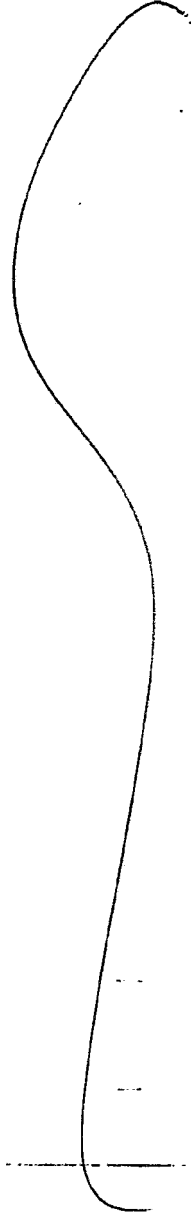
Centímetros cúbicos de Tween <sup>®</sup> 80 al 1 %	Centímetros cúbicos de
1,0	1,
0,8	0,
0,6	0,
0,4	0,
0,2	0,
0,1	0,
0,05	0,
0,0 (Contrastación)	0,

-7-1941

L A 1  
=====



ros cúbicos de Polyol <sup>®</sup> F68 al 1 %	Tiempo para la disolución en minutos.	
	Con vacío	Sin vacío
	7	8
1,0	10	13
	10	11
0,8	12	35
	10	16
0,6	32	77
	23	28
0,4	45	90
	30	32
0,2	210	210
	42	49
0,1	210	210
	100	100
0,5	210	210
0,0 (Contrastación)	210	210



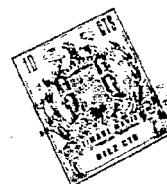
-2-

T A B L A 1 (Continuación)

Centímetros cúbicos de Tween® 80 al 2 %	Centímetros cúbicos de Polyoil® F68 al 2 %	Tiempo para la disolución en minutos	
		Con vacío	Sin vacío
1,0**		7	21
1,0			11
	1,0*		34
	1,0	17	18
0,8		8	21
	0,8	17	20
0,6		15	18
	0,6	10	20
0,5**			20
0,5		10	18
	0,5*		18
	0,5*	6*	16

T A B L A 1 (Cont:)

Centímetros cúbicos de Tween <sup>®</sup> 80 al 2 %	Centímetros cúbicos de
1,0 *	
1,0	1,
	1,
0,8	0,
0,6	0,
0,5 *	0,
0,5	0,



1 (Continuación)

38	cúbicos de Polyol <sup>®</sup> F68 al 2 %	Tiempo para la disolución en minutos	
		Con vacío	Sin vacío
			21
		7	11
	1,0 *		34
	1,0	17	18
		8	21
	0,8	17	20
		15	18
	0,6	10	20
			20
		10	18
	0,5 *		18
	0,5 *	6 *	16



- 9 -  
374539



\* 50 miligramos de sal añadidos antes de la liofilización. Reconstituida con 5,0 cc. de agua.

EJEMPLO II

5. Procedimiento para la Preparación de un Producto de Globulina Gamma Liofilizada

Se depositó una porción de 1,0 litro de globulina de suero inmune al 16 % (ISG) en glicina 0,3 molar en un recipiente estéril exento de pirógenos. Se añadió al recipiente una porción de 600 cc. de una solución preparada mezclando 120 cc. de una solución al 1 % de Pluronic Polyol<sup>®</sup> F68 y 480 cc. de agua exenta de pirógenos, para obtener una concentración final de un 0,07 % de agente tensioactivo. Se agitó con turbulencia el contenido para asegurar una mezcla completa. Se llenaron frasquitos de 10 cc. exentos de pirógenos estériles en una proporción de 2,5 cc. por frasquito (aproximadamente 250 mg de ISG).

Los frasquitos llenos se congelaron en condiciones estériles en una posición vertical en alcohol-hielo seco y se deshidrataron al vacío. Después de la operación de deshidratación, se cerraron los frasquitos con tapones estériles y se precintaron.

Se preparó un diluyente para reconstitución mezclando 8,5 g de glicina y agua exenta de pirógenos hasta alcanzar una concentración de 0,113 molar. El diluyente se depositó asépticamente (2,5 cc.) en una serie de frasquitos apropiados.

Para efectuar la reconstitución, se sacó el diluyente de glicina de un frasquito, emplean-

374539

13



do una jeringuilla estéril y se depositó en un frasco que contenía la pastilla seca de ISG para obtener una concentración final de glicina de 0,3 molar. Agitando de vez en cuando se obtuvo la disolución completa en unos 7 minutos. Las muestras que se habían congelado lentamente precisaban un promedio de tiempo de unos 45 minutos para la reconstitución. Las muestras deshidratadas sin agente tensioactivo, tanto si se congelaron rápidamente como si se congelaron lentamente, precisaron un periodo de 2 horas para la reconstitución.

EJEMPLO III

Efecto del Tween <sup>(R)</sup> 80, Polyol <sup>(R)</sup>

80 y Metanol Residual Durante la Liofilización sobre la Solubilidad de Globulina de Suero Inmune (ISG)

Se molió una parte de placenta entera, se extrajo con solución salina 0,15 M y se dese-  
chó la pulpa carnea. Después se trató la suspensión salina con metanol hasta alcanzar una concentración del 25 % a -5°C. Se precipitaron y recogieron globulinas gamma más globulinas alfa y beta. Se preparó una suspensión de un kilogramo de la globulina precipitada en 5 litros de solución salina 0,15 M, y se añadieron 8 litros de una solución al 0,4 % de lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina. Al añadir el lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina, se precipitaron las globulinas alfa y beta y el filtrado, que se conservó, se trató con metanol hasta alcanzar una concentración del 50 %. Se volvió a formar una suspensión con el precipitado en 3,3 litros de solución salina 0,15 M fría y se

- 11 -  
374539



- filtró. Se ajustó el filtrado a 0,05 M con fosfato disódico y se ajustó a un pH de 7 a 8. Se añadió bentonita, con una concentración del 1 al 2 %, y se agitó la mezcla a 2°C durante 1 hora. Se centrifugó la mezcla,
5. se clarificó por filtración y se añadió un volumen igual de agua al filtrado, ajustando el pH a 7,4. Se añadió metanol hasta una concentración del 25 % y se recogió la globulina gamma que se había precipitado, se liofilizó, se reconstituyó a una solución al 16 % con solución de glicina 0,3 M y se conservó con 1:10.000 mertiolato.
- 10.

Se prepararon y liofilizaron las soluciones siguientes:

15. Solución I, contrastación, 1,282 l. de la solución ISG anterior;

Solución II, 1,282 l. de la solución ISG anterior y 30,0 cc de Tween<sup>®</sup> 80 al 1 %;

Solución III, 1,282 l. de la solución ISG anterior y 30,0 cc de Polyol<sup>®</sup> F68 al 1 %.

20. Los polvos resultantes contenían de un 3 % a un 4 % de proteína. Cada 500 mg de polvo ISG se reconstituyeron con solución salina al 0,85 %. La concentración de anticuerpos no se vio afectada por los agentes tensioactivos.

25. En la tabla II se indican los resultados obtenidos.

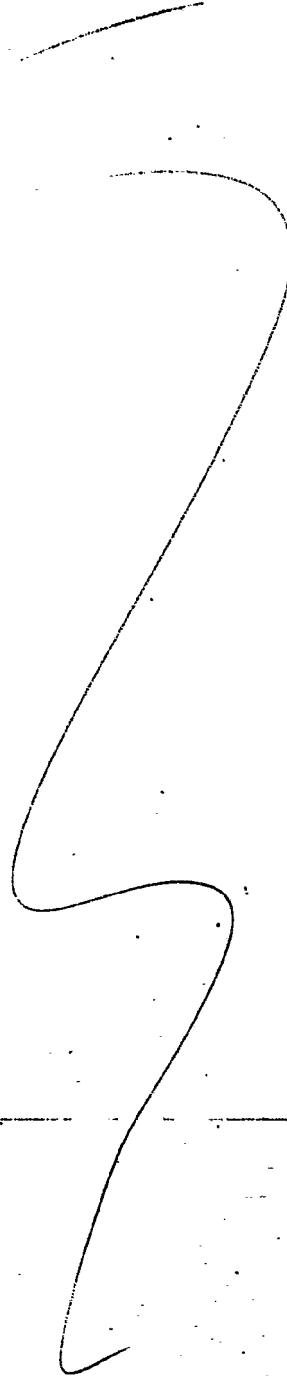
30. Aunque el invento se ha descrito e ilustrado con relación a ciertas modalidades particulares, se comprenderá que en sus aspectos más generales

374539

13



el invento no se limita a dichas formas de realización y que se puede recurrir a variaciones y sustituciones de dichos equivalentes dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.



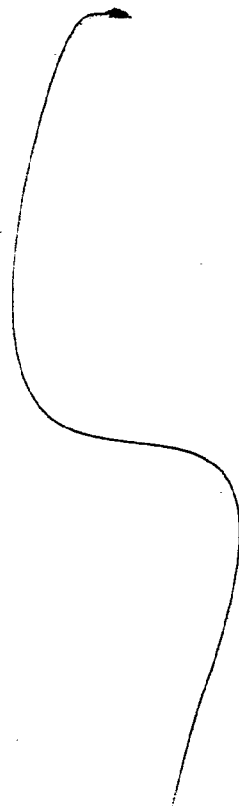
- 13- 124

T A B L A II  
=====

	Polvo. Rendimiento (gramos)	Reconstitución. Tiempo (minutos)	Valoración difteria 3', 5"	Valoración polio 1:2896	Valoración sarampión 1:664	Apariencia
Solución I	33,5	6,0	3', 5"	1:2896	1:664	Ligeramen- te túrbide
Solución II	35,1	1,0	3', 5"	1:2580	1:724	Transparen- te
Solución III	34,4	2,0	3', 5"	1:2680	1:664	Transparen- te

T A B L A II

	Polvo. Rendimiento (gramos)	Reconstitución. Tiempo (minutos)	Valoración difteria	Valoración
Solución I	33,5	6,0	3 <sup>+</sup> , 5 <sup>-</sup>	1:289
Solución II	35,1	1,0	3 <sup>+</sup> , 5 <sup>-</sup>	1:258
Solución III	34,4	2,0	3 <sup>+</sup> , 5 <sup>-</sup>	1:268



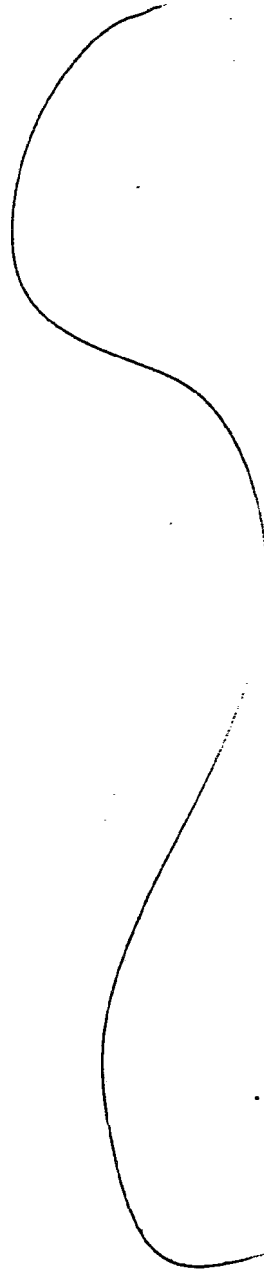
-13- 124



A. II

37470

Valoración polio	Valoración sarampión	Apariencia
1:2896	1:664	Ligeramen- te túrbida
1:2580	1:724	Transparen te
1:2680	1:664	Transparen te





NOTA

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones

5. ciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PROTEINAS LIOFILIZADAS DE ANIMALES HOMOTERMOS, caracterizándose por lo siguiente:
- 10.

1.- Procedimiento para la preparación de proteínas liofilizadas de animales homotermos; con una capacidad mejorada para la reconstitución, caracterizado porque se añade como agente tensioactivo a la proteína sin liofilizar polioxaleno o polisorbato 80; se enfría rápidamente la mezcla resultante a un estado congelado y se deshidrata al vacío.

15.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína es globulina gamma humana y la cantidad de dicho agente tensioactivo, basada en el peso de dicha proteína, es aproximadamente de un 0,07 % a un 1,5 %.

20.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha mezcla resultante se introduce en frasquitos antes de la operación o etapa de refrigeración.

25.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque los frasquitos que contienen la proteína se enfrían por inmersión en un medio refrigerante que comprende una mezcla de etanol

30.

37453913  
y hielo seco (CO<sub>2</sub>).



5.- Procedimiento para la preparación de proteínas liofilizadas de animales homotermos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

5.

Esta Memoria consta de 15 hojas escritas a máquina por una sola cara

Madrid

AMERICAN CYANAMID COMPANY

13 DIC 1969

GÓMEZ ACEBO Y MODER  
Firmados: F. Hernández Ruiz