

F. C. 31-V-75



694567

Int. Cl.² B01J, C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a una PATENTE DE INVENCION por "Método para la purificación de transferrina", a favor de Laboratorios Hubber, S.A., entidad española, domiciliada en Barcelona, calle Berlín, 38.

Int. Cl.⁴ B01J 47/00, C07K 15/00

...



Conforme se indica en el enunciado, la presente invención hace referencia a un método para la purificación de transferrina, substancia también conocida en el mercado con los nombres de: B globulina férrica, siderofilina o metaloseromucoide B.

5. La transferrina es una proteína del plasma o suero humano, que efectúa el transporte de hierro y confiere defensas contra ciertas infecciones.

Los procedimientos conocidos para la obtención de la transferrina, son muy variados. Unos se basan en la precipitación por sales, tales como el sulfato amónico, el sulfato sódico, el sulfito sódico, etc. Posteriormente, Cohn y colaboradores (J. Am. Chem. Soc. 68 : 459 (1946), y J. Am. Chem. Soc. 72 : 465 (1950)), desarrollaron el método de fraccionamiento del plasma con alcohol a baja temperatura. Otros métodos de fraccionamiento con disolventes orgánicos, utilizan acetona, éter, etc.

15. El procedimiento más difundido es el de Cohn, con diversas modificaciones con objeto de mejorar la pureza de las fracciones o rendimiento, facilidad de operación, disminución de coste, etc. Con este procedimiento se obtiene transferrina muy impurificada con otras fracciones plasmáticas, como albúmina, ceruloplasmina, globulinas alfa y beta.

20. La eliminación de estas impurezas resulta muy compleja, incluyendo dos procesos propiamente dichos, con el primero de los cuales se obtiene transferrina impura, pero presente en forma mayoritaria en el producto resultante, mientras con el segundo se logra transferrina electroforéticamente pura.

25. La presente invención se refiere a un método de purificación basado en las distintas propiedades ácido-básicas de las proteínas. Conociendo el punto isoelectrico de cada proteína, se puede lograr la absorción por una resina determinada, ajustando el pH de la solución al valor más conveniente. Así, por ejemplo, la albúmina, que es la proteína de carácter más ácido del plasma, con un punto isoelectrico de 4,9 es absorbida

30. por una resina aniónica cuando la solución tiene un pH alcalino entre 7,5 y 8,5.

3.

414561 27



En una solución de transferrina conteniendo como impurezas principales la albúmina, la ceruloplasmina y las globulinas alfa, beta y gamma, se pueden eliminar estas impurezas tratando con una resina aniónica básica, en solución acuosa a pH 7,0 a 8,0 y eluyendo de forma selectiva la transferrina, absorbida a pH coincidente con el del punto isoléctrico de la proteína en cuestión.

Según el método objeto de la actual invención, pueden ser ventajosamente empleadas como resinas aniónicas, las de destranos con grupos Dietil - (2 - hidroxipropil) - aminoetil, o resina dietilamino etil celulosa.

A título ilustrativo, se detalla a continuación un ejemplo de procedimiento, según es ya conocido, para la obtención de transferrina impura, partiendo de un kilo de fracción IV obtenida de un pool de plasma de diferentes dadores.

Esta fracción se suspende en diez volúmenes de agua bidestilada, estéril y apirógena, a temperatura ambiente, y se agita hasta obtener una suspensión perfecta. Se le añade una cantidad de lactato de ethoxidiaminoacridina comprendida entre aproximadamente el 20 y el 40 por ciento de equivalencia al peso de la fracción IV, si fuese liofilizada.

Se ajusta el pH con solución de hidróxido sódico 1 normal, a un valor oscilante entre 8 y 8,2.

Después de agitar debidamente durante no menos de dos horas y no más de cuatro, se deja decantado a temperatura ambiente, entre veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

Se separa el sobrenadante y se procede a filtrar el líquido, solución proteica, que será intensamente coloreado de amarillo, por medio de placas de asbestos clarificantes (tipos D₂, D₃ y D₅) hasta obtener un filtrado claro y transparente.

A la solución se le añade carbón activo, para obtener absorbido el exceso de lactato de ethoxidiaminoacridina, se verifican adiciones sucesivas de carbón activo, de 50 gramos cada vez, dejando decantar, hasta que el sobrenadante quede incoloro, o muy ligeramente amarillo.

4.

Se filtra nuevamente la solución por placas de asbestos clarificantes D₂, D₃ y D₅, para eliminación del carbón activo.

- A continuación se procede a eliminar las globulinas que están presentes como impurezas, por medio de precipitación alcohólica o sulfato amónico, siendo las condiciones precipitantes las determinadas por los medios normales de precipitación de estas proteínas, es decir, por ejemplo para el etanol, a una concentración del 25% a una temperatura entre 5° y 7°C, y a un pH comprendido entre 6,4 y 7,4.

Se centrifuga con centrifugas tipo Sharples.

10. El sedimento obtenido puede precipitarse por medio de sulfato amónico, o precipitación alcohólica. En este último caso, se ajusta el volumen resultante a concentración alcohólica final del 35 / 40%, ajustándose previamente el pH entre 4,9 y 5,5 y la temperatura -6° a -8°C. Se deja en estas condiciones un período de no menos de seis horas, y luego se puede proceder a su decantación o centrifugación directa en centrifugas tipo Sharples.

El precipitado obtenido, de color rosado, se disuelve en agua o en medio fisiológico, se congela rápidamente y se liofiliza, obteniéndose una transferrina impura.

20. Entrando ya en el tema específico de la actual invención, cual es el de la purificación de tal transferrina, conviene anotar que el empleo de procedimientos de fraccionamiento para purificar al máximo las proteínas, comporta operaciones muy costosas, con un rendimiento muy bajo, lo que hace que se desestimen estos métodos para purificar proteínas específicas.

25. Un procedimiento de purificación ya conocido en sí, se realiza con medios puramente físicos, basándose en cromatografía en columna, utilizando resinas adecuadas, para llevar a cabo la separación de los distintos componentes en función de sus diversos pesos moleculares.

30. Es más conveniente basar la purificación en las propiedades ácido-básicas de las proteínas, formando enlaces estables de las proteínas con resinas iónicas adecuadas, en condiciones de pH y fuerza iónica que vienen determinadas por el punto isoelectrico de cada proteína. En el

5.

414561



caso de la transferrina, el punto isoelectrico es de 5,9.

Para purificarla, se puede partir de solución de transferrina impura, a concentración del 1 al 20%.

- Se eleva el pH de la solución, si fuera necesario, a valores de 7,0 - 8,0. En estas condiciones, la gammaglobulina no se absorbe, quedando en solución, que se desecha. La adición de resina en este momento, hace que se enlacen las proteínas restantes. El tipo de resina puede ser muy variado: dietilamino-etil-celulosa, dietilamino-etil-sephadex, dietilamino (2-hidroxipropil) aminoetil sephadex. Estas resinas pueden ser equi-
10. libradas para su uso con tampones especiales, o bien simplemente en agua para no hacer intervenir sales en el proceso de purificación, lo que comportaría posteriormente una diálisis o una cromatografía en columna para eliminarlas.

- Finalmente, para eludir la transferrina pura, se utilizan variaciones del pH entre 5,5 y 6,3, con tampón fosfato-acético-acetato.
15. O, simplemente, con soluciones de ClNa, a un mismo pH uniforme, durante toda la elución y variando en este caso la concentración de ClNa progresivamente.

- Seguidamente, con valor ilustrativo pero no restrictivo, se hace mención de tres ejemplos concretos relativos al método objeto de la actual invención.
- 20.

Ejemplo 1.- Una solución de transferrina impura al 1 / 10%, en agua destilada, se trata con resina dietilamino-etil-celulosa a pH = 7,5 en columna o en baño, las proteínas absorbidas se desechan (gammaglobulina principalmente). La resina lavada con agua a pH = 7,5 hasta que no salga proteína, estará lista para eluir. Se luye con tampón fosfato-acético-acetato a pH = 5,9 para obtener la transferrina pura, exenta de contaminantes.

25.

Ejemplo 2.- Una solución de transferrina impura al 10 / 20% en agua destilada, se trata con resina dietilamino-etil-sephadex, lavada en agua, en baño o en columna a pH = 7,2 - 7,5. Las proteínas absorbidas se desechan (gamma globulina principalmente). La resina lavada con agua a pH = 7,2 o solución 1/10 fisiológica a pH = 7,2, hasta que no salgan proteínas, que-

30.



dará lista para eluir. Se eluye con tampón fosfato-acético-acetato a pH = 5,8 - 6,0 para obtener la transferrina pura libre de contaminantes.

Ejemplo 3.- Una solución de transferrina impura al 5 / 10% en agua o solución fisiológica 1/10 se trata, a pH = 7,0 - 7,5 con resina dietil

5. (2-hidroxipropil) aminoetil-sephadex lavada en agua; en baño o en columna, las proteínas no absorbidas se desechan (gammaglobulina principalmente). La resina lavada con solución fisiológica 1/10 a pH = 7,0 - 7,5 hasta que no salgan proteínas, estará lista para eluir. Se eluye en baño con tampón fosfato-acético-acetato a pH = 5,9 o en columna aumentando la concentración de soluciones de cloruro sódico a pH = 5,9 para obtener una transferrina pura, sin contaminantes.

El número de ejemplos podría ser ampliado variando alguna de las constantes, como son: concentración de origen, pH, eluciones, etc.

15. Como es evidente, se trata de un aspecto perfectamente variable a los efectos de la actual invención, quedando comprendido en la esencialidad de la misma.

El producto final puede ser liofilizado o bien conservado en solución 5% en medio fisiológico y en refrigerador.

20. De un modo general, el actual método es variable en todo aquello que no modifique o altere su esencialidad, que es la que se indica en la primera de las reivindicaciones que siguen, ya sea considerada aisladamente, ya sea considerada junto con una o las dos reivindicaciones restantes.

N O T A.

25. Se declara de novedad y propiedad, para España y sus territorios, las siguientes

REIVINDICACIONES.

30. 1. Método para la purificación de transferrina, caracterizado porque la eliminación de las impurezas se realiza mediante una resina aniónica intercambiadora de iones, preferiblemente hinchada en agua añadida a la solución de proteínas, para posterior elución fraccionada de las proteínas absorbidas, efectuada por concentraciones de cloruro sódico en agua de fuerza iónica variable.

M

7.

414561



2. Método para la purificación de transferrina, según la reivindicación anterior, caracterizado porque la elución fraccionada de las proteínas absorbidas tiene lugar por variaciones de pH entre 7,5 y 3,0 recogiendo la fracción comprendida entre el pH 5,5 y 6,3.

5. 3. Método para la purificación de transferrina, según la reivindicación 1, caracterizado porque la eliminación de las impurezas mediante una resina aniónica intercambiadora de iones, es susceptible de realizarse hinchada en agua en columna cromatográfica para posterior elución fraccionada de las proteínas absorbidas por elución con concentraciones de cloruro sódico en agua de fuerza iónica variable.

4. Método para la purificación de transferrina.

Todo ello, tal y como se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de siete hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

15. Barcelona, 27 de abril de 1973.

LABORATORIOS HUBBER, S. A.
Directo General

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Hubber".



A handwritten signature in black ink, appearing to be "RRR".