



416597

416597

Int. Cl.: 0076// A61K

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

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

INSTITUT MERIEUX

sociedad anónima francesa, domiciliada en
17, rue Bourgelat, LYON 2, Francia, rela-
tiva a:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ALBUMINA
PURIFICADA"

=====

Inventores: Robert Plan, Jacques Liautaud,
Marie-France Makula, Paule Gattel,
Jean Pla y André Debrus

Prioridad: Solicitud de patente en Francia nº
72 24311 de fecha 5 Julio 1972.

416597



MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de albúmina purificada, en particular albúmina humana. - - - - -

5. El procedimiento según la invención permite, en particular, preparar la albúmina purificada tanto a partir de primeras materias no contaminadas por la hemoglobina, como por ejemplo el plasma, como a partir de materias contaminadas por la hemoglobina, como por ejemplo las placentas, la sangre placentaria o de una manera general cualquier sangre hemolizada. - - - - -

15. Existen ya un cierto número de procedimientos de preparación de albúmina purificada ninguno de los cuales ha permitido sin embargo producir, por lo menos a un precio de coste suficientemente económico, cantidades importantes de albúmina purificada no desnaturalizada, sobre todo en el caso en que la materia prima es una materia que contiene numerosas impurezas y particularmente hemoglobina. - - - - -

20. La presente invención se propone pues proporcionar un procedimiento de preparación de albúmina purificada, en particular de albúmina humana, que sea de realización simple y económica, y que permita preparar industrialmente grandes

416597



grandes cantidades de albúmina muy purificada, a partir de las fuentes más corrientes. - - - - -

5. La albúmina purificada obtenida, cuando es de origen humano, puede servir para la preparación de soluciones de proteínas utilizables como líquidos de transfusión, por ejemplo para el tratamiento de estados de shock o en el caso de disminución peligrosa de la cantidad de sangre circulante.

10. Esta albúmina purificada es soportada particularmente bien por el organismo receptor y no provoca las reacciones que se producen a menudo con las preparaciones de albúmina clásicas. - - - - -

15. La invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de albúmina purificada, en particular de albúmina humana, a partir de una solución de albúmina a purificar, que contiene proteínas extrañas o desnaturalizadas, caracterizado porque se efectúa una termocoagulación de estos elementos indeseados por calentamiento de la solución en presencia de ácido caprílico a una temperatura comprendida entre 52°C y 64°C, y preferentemente entre 56°C y 60°C. La termocoagulación se efectúa preferentemente durante un tiempo por lo menos igual a 30 minutos con la ayuda de una cantidad en peso de ácido caprílico que, expresada en peso de caprilato de sodio, está comprendida entre 15% y 30% del peso en proteínas de la solución, a un pH comprendido entre 4,8 y 5,25.

25. De forma ventajosa, se utiliza preferentemente una

416597



solución a purificar en la cual el contenido en proteínas es inferior a 50 gramos por litro y preferentemente situada en la proximidad de 20 gramos por litro. - - - - -

- En un modo de realización preferido, el ácido caprílico se introduce en forma de caprilato de sodio, pero es también posible introducirlo en otras formas, como por ejemplo en forma del ácido mismo y no en forma de una sal. En este caso, el contenido en ácido caprílico será determinado por un simple cálculo a partir de los valores precedentes que corresponden al caso en que el ácido caprílico es introducido en forma de caprilato de sodio. - - - - -
- 5.
 - 10.

De una manera general, el pH se elige tanto mayor cuanto más importante es la proporción de caprilato con respecto a las proteínas. - - - - -

- Así, a título de ejemplo, cuando el contenido en caprilato es igual al 15% del contenido en proteínas, el pH será preferentemente del orden del 4,85 a 4,95, mientras que para un contenido en caprilato igual al 20% del contenido en proteínas, el pH más favorable estará comprendido entre el 4,95 y 5,05. Para un contenido en caprilato del 25% el pH será preferentemente próximo a 5,1, en tanto que para un contenido del 30% en caprilato, el pH será ventajosamente del orden de 5,15. - - - - -
- 15.
 - 20.

- La termocoagulación así efectuada permite eliminar una gran parte de la hemoglobina y precipitar la albúmina
- 25.

416597



desnaturalizada así como las proteínas extrañas. - - - - -

En el caso en que la solución a purificar haya sido obtenida a partir de un origen plasmático, el procedimiento precitado permite obtener directamente una albúmina purificada directamente utilizable. - - - - -

En el caso en que la solución a purificar proviene de una fuente previamente contaminada por cuerpos extraños, por ejemplo placenta, sangre placentaria o sangre hemolizada, se puede hacer ventajosamente preceder la termocoagulación por una, por lo menos, de las etapas que consisten en - eliminar la mayor parte de la hemoglobina, en eliminar los enzimas tales como las fosfatasas alcalinas por precipitación de las proteínas con la ayuda de un ácido tal como el ácido tricloroacético los ácidos polifosfóricos, y en eliminar las sustancias de grupo. - - - - -

La eliminación de la hemoglobina puede ventajosamente efectuarse en presencia de una concentración de etanol inferior al 60% con adición de un hidrocarburo halogenado - tal como el cloroformo. La misma sin embargo puede también efectuarse por adición de un hidrocarburo halogenado sin alcohol o por otros procedimientos conocidos en sí. - - - - -

La eliminación de los enzimas tales como las fosfatasas que se efectúa preferentemente después de la etapa de eliminación de la hemoglobina, se efectúa preferentemente - en presencia de una concentración de etanol inferior al 60%,



416597

5 con adición de ácido tricloroacético. La concentración del ácido puede estar comprendida entre 3 y $10 \cdot 10^{-2}$ M/litro y es preferentemente del orden de $4,2 \cdot 10^{-2}$ M/litro, adicionándose el ácido a la solución proteica a una temperatura inferior a 0°C y preferentemente comprendida entre -5 y -10°C, hasta - precipitación total de las proteínas. - - - - -

Además de la eliminación de los enzimas, esta etapa permite igualmente concentrar notablemente la cantidad de albúmina en solución debido a que la albúmina precipita. - - -

10. En ciertos casos, es posible remplazar la precipitación con el ácido tricloroacético por una precipitación con un ácido polifosfórico. - - - - -

15. La etapa de eliminación de sustancias de grupo se efectúa preferentemente con una concentración en etanol superior a 55%, por ejemplo del orden de 75%, con una concentración de proteínas de preferencia inferior o igual a 10g/litro adicionando ácido tricloroacético a la solución a una temperatura inferior a 0°, comprendida por ejemplo entre -5 y -10°C. La cantidad de ácido tricloroacético puede ventajosamente ser del orden $8 \cdot 10^{-2}$ M/litro. El precipitado obtenido es desechado. En este estado, las sustancias de grupo son - eliminadas. - - - - -

20. Esta etapa permite también eliminar las fosfatasas alcalinas, de manera que la etapa precedente de eliminación de las fosfatasas puede eventualmente ser suprimida. La misma

25.

416597



es entonces preferentemente remplazada por una simple concentración de las proteínas. - - - - -

Otras ventajas y características de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente, dada en

5. título de ejemplo no limitativo, y del plano anexo en el cual:

la figura 1 representa las curvas de porcentaje de hemoglobina y de rendimiento en proteínas en función del pH para un primer lote de albúmina, - - - - -

la figura 2 representa las curvas para otro lote, -

10. la figura 3 representa las curvas de rendimiento en albúmina y de porcentaje de hemoglobina en función del contenido en caprilato para un mismo valor del pH. - - - - -

Con referencia a las figuras. - - - - -

15. En la figura 1 se han representado, en función del pH, llevado en abscisa, unas curvas R de rendimiento en proteínas y H de porcentaje de hemoglobina después de tratamiento con caprilato. El lote de albúmina humana placentaria contenía inicialmente 20g de proteínas, principalmente de albúmina, por litro y un poco menos del 0,2 en porcentaje de hemo-

20. globina (densidad óptica de una solución al 1%). La curva R representa así el peso en gramos por litro de proteínas, esencialmente de albúmina que queda en solución después de termocoagulación con caprilato. La coloración H de la albúmina es evaluada fotométricamente por simple lectura del espectrofotómetro



416597

Beckmann, a 403m μ después de haber ajustado la solución a 10g de proteínas por litro. - - - - -

5. Como se ve en la figura, para una cantidad de caprilato igual a 2g por litro, es decir al 10% del peso inicial en proteínas, las curvas R_{10} y H_{10} , que corresponden a este contenido en caprilato, son sensiblemente horizontales. Esto quiere decir que no hay prácticamente proteínas que precipiten y que el porcentaje de hemoglobina permanece prácticamente constante. Para un contenido igual al 10% de caprilato,

10. no es pues posible efectuar la termocoagulación según la invención. - - - - -

15. Si se utiliza ahora el 15% en peso de caprilato con respecto al peso de proteínas, es decir 3g de caprilato por litro, los resultados están representados en las curvas R_{15} y H_{15} . Se ve que el rendimiento en proteínas es tanto más elevado, cuanto mayor es el pH pero el porcentaje de hemoglobina evoluciona de la misma manera. Sin embargo, para un pH próximo a 4,8, es posible hacer disminuir más de la mitad el porcentaje de hemoglobina, a condición de permitir una pérdida del orden de 4g por litro en proteínas. Acerca de ello,

20. conviene destacar que la pureza de la albúmina obtenida por el procedimiento según la invención es relativamente independiente del rendimiento en proteínas, puesto que las proteínas extrañas y la fracción desnaturalizada de la albúmina precipitan en primer lugar. Es suficiente pues tener un precipitado franco para tener la seguridad de haber eliminado la casi totalidad de las proteínas indeseables. La prosecución de la

25.

416597



precipitación elimina una parte de la albúmina pura y hace
pues bajar el rendimiento. - - - - -

5. Cuando el contenido en caprilato es igual al 20% del
contenido inicial en proteínas, es decir a 4g por litro, los
resultados están referidos en las curvas R_{20} y H_{20} . Se ve
que para un pH próximo a 4,95 a 5, se conserva aún una canti-
dad notable de albúmina purificada, reduciendo al mismo tiem-
po netamente el contenido en hemoglobina. - - - - -

Con referencia a la figura 2. - - - - -

10. Un segundo lote de albúmina placentaria ha sido tra-
tado, en las curvas R' y H' representan respectivamente el
contenido en proteínas y el porcentaje en hemoglobina des-
pués de termocoagulación. - - - - -

15. Para un contenido en caprilato igual al 20% del peso
inicial, de 20g por litro, en proteínas de la solución a ter-
mocoagular, se obtiene una curva a R'_{20} de rendimiento en -
proteínas, que corresponde sensiblemente a la curva R_{20} . La
curva H'_{20} toma un carácter que es igualmente próximo a la
curva H_{20} y, allí también, la zona más favorable está situa-
da en los alrededores de un pH igual a 5. - - - - -

20. Si aumenta el contenido de caprilato, con referen-
cia a las curvas R'_{25} y H'_{25} que corresponden a un contenido
de caprilato del 25%, se constata que una zona favorable es-
tá presente para un pH próximo a 5,1. - - - - -



416597

Finalmente, para un contenido de caprilato del 30%, los resultados representados en las curvas R₃₀ y H₃₀ muestran que el pH óptimo se halla situado en los alrededores de 5,15. Es, en efecto, en esta zona del pH que se obtiene un descenso importante del porcentaje de hemoglobina para un rendimiento en albúmina aún conveniente. - - - - -

5.

Con referencia a la figura 3, se ve el comportamiento para un lote de albúmina termocoagulada en función del porcentaje de caprilato, a un mismo pH igual a 5. La temperatura es de 60°, la termocoagulación se efectúa en 1 hora. Se constata que el rendimiento en proteínas, igual que el porcentaje de hemoglobina baja cuando el contenido de caprilato aumenta, pero se alcanza un punto óptimo para un contenido en caprilato de 20%. En efecto, para este valor, el rendimiento es igual al 90%, lo que quiere decir que solamente el 10% de las proteínas han precipitado, en tanto que el porcentaje de hemoglobina ha pasado de aproximadamente 0,20 a un valor comprendido en 0,1 y 0,05. - - - - -

10.

15.

Se describirá ahora un ejemplo de realización detallada del procedimiento según la invención. - - - - -

20.

A partir de siete toneladas aproximadamente de placenta se prepara, de una forma en sí conocida, el sobrenadante de las globulinas por precipitación de las globulinas por etanol. - - - - -

25. 1ª.- Eliminación de la hemoglobina:



416597

Se adiciona el sobrenadante alcoholico al 25% de etanol y que contiene aproximadamente 58g de proteinas por kg de placenta, cloroformo de forma que el volumen total de aproximadamente 17.000 litros contenga 0,6% de cloroformo.

5. Se ajusta el pH a un valor comprendido entre 6,0 y 6,1. - -

Manteniendo el sobrenadante en estas condiciones a una temperatura del orden de 24°C, se forma un precipitado que se separa y se desecha. - - - - -

10. El volumen de sobrenadante se halla por este hecho reducido a aproximadamente 16.000 litros. En este momento, el rendimiento protéico es del orden de 8g/kilo y la mayor parte de la hemoglobina ha sido eliminada. - - - - -

2º.- Eliminación de los enzimas: - - - - -

15. Se adiciona al sobrenadante de 16.000 litros obtenido precedentemente y que contiene aproximadamente 25% de etanol, después de descender la temperatura a -8°C, ácido tricloroacético para obtener una concentración de $4,2 \cdot 10^{-2}$ M/litro. - - - - -

La cantidad de proteinas es del orden del 4g/litro.

20. Se obtiene de esta manera un precipitado de aproximadamente 1.000 kg en cuanto que el sobrenadante, de un volumen de aproximadamente 15.000 litros, es desechado. A este objeto, se utilizan preferentemente unas centrifugadoras heréticas de eyección continua del precipitado. - - - - -

416597



De esta forma, las fosfatasa alcalinas y otros enzimas, tales como las transaminasas son eliminados o desnaturalizados. - - - - -

El precipitado es seguidamente redisuelto en sosa diluida hasta un pH neutro y el volumen se ajusta a 1.300 litros con agua. - - - - -

3º.- Clarificación: - - - - -

Este precipitado redisuelto recibe una adición de polvo de silice (aerosil) para obtener una concentración de aerosil de aproximadamente 0,2%. Se forma así un precipitado de aproximadamente 50 kg que es desechado por centrifugación. La solución sobrenadante clarificada corresponde a un rendimiento protéico de aproximadamente 6,6g por kilo. - - - - -

4º.- Eliminación de las sustancias de grupo: - - - - -

Se recuerda que las sustancias de grupo están principalmente constituidas por polisacáridos de paredes de hematíes que se han disuelto al tener lugar la hemolisis y que deben ser eliminados. - - - - -

La solución clarificada es diluida en una mezcla de etanol y ácido tricloroacético, siendo el porcentaje final de alcohol de aproximadamente 75% y el porcentaje de ácido tricloroacético de aproximadamente $8 \cdot 10^{-2}$ M/litro. El contenido en proteínas es del orden de 10g/litro. Manteniéndose en la temperatura a aproximadamente -7°C , se forma un precipitado de aproximadamente 10kg que es desechado y las sus-

416597



tancias de grupo eliminadas. Esta etapa completa también la eliminación de los eventuales enzimas residuales. - - - - -

El sobrenadante que contiene aproximadamente 8g de proteínas por litro es filtrado. Se ajusta el pH a un valor comprendido entre 6,5 y 7, manteniéndose siempre la temperatura entre -5° y -10°C. En este momento, se forma un precipitado de albúmina que es centrifugado. - - - - -

Se obtienen así 140 kg aproximadamente de precipitado y se desecha el sobrenadante. - - - - -

5°.- Purificación de la albúmina: - - - - -

El precipitado es redissuelto en agua para formar un volumen de aproximadamente 280 litros, siendo el rendimiento protéico en este momento de 5g/kilo. - - - - -

Después de una diálisis con agua destilada para eliminar el alcohol, se ajusta el porcentaje de proteínas a 20g/litro, se adiciona a la solución caprilato de sodio a una concentración de $2,41 \cdot 10^{-2} M$ /litro (4g/litro) y se ajusta, por ejemplo con un tampón acético, el pH a un valor comprendido entre 5,0 y 5,05. - - - - -

Esta solución se mantiene a 60°C durante aproximadamente 1 hora. - - - - -

Las proteínas restantes, salvo la albúmina, son así coaguladas y son desechadas en un precipitado con las últimas



416597

trazas de hemoglobina así como la fracción desnaturalizada de la albúmina. Queda solamente en solución la albúmina prácticamente pura. - - - - -

5. El sobrenadante llevado a aproximadamente 1.750 litros es seguidamente filtrado. La solución diluida de albúmina es entonces concentrada ajustando 40% de etanol a un pH comprendido entre 4,8 y 4,9, a una temperatura del orden de -8°C. Se forma entonces un precipitado que es recogido y después redisolto, siendo esta nueva solución entonces dializada y después tratada sobre gel de alúmina. Se efectúa seguidamente una concentración bajo vacío y después una filtración esterilizante que dá aproximadamente 95 litros de solución concentrada prácticamente pura de albúmina a 200g/litro. En este estado final, el rendimiento protéico es del orden de 2,7g/kilo. La coloración de la solución es comparable a la de la mayor parte de las buenas soluciones de origen plasmático. - - - - -

10.

15.

20. La invención descrita con la ayuda de este ejemplo es desde luego susceptible de numerosas variantes. Así, algunas de las etapas preliminares pueden ser omitidas o incluso remplazadas por etapas similares en sí ya conocidas. Además, el orden en el qual estas etapas preliminares han sido llevadas puede ser modificado. - - - - -

25. La albúmina humana así preparada está desprovista de sustancias de grupo y de fosfatasas alcalinas placentarias, y no producen efecto hipotensor en el perro perfusionado

416597



Su bajo porcentaje de hemoglobina la hace comparable e inclu
so superior a la mayor parte de las albúminas de origen plas
mático. - - - - -

Esta albúmina puede ser utilizada con fines terapéu
ticos en el hombre sin inconvenientes y responde a todos los
criterios establecidos para el control de la albúmina. - - -

N O T A

Se declara 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

1.- Procedimiento de preparación de albúmina purifi
cada, en particular de albúmina humana, a partir de una solu
ción de albúmina a purificar que contiene proteínas extrañas
o desnaturalizadas, en la cual se efectúa una termocoagula
ción de estos elementos indeseados por calentamiento de la -
solución en presencia de ácido caprílico, caracterizado por
que el pH está comprendido entre 4,8 y 5,25, porque la canti
dad de ácido caprílico, expresada en peso de caprilato de so
dio, está comprendida entre 15% y 30% del peso de proteínas
de la solución a purificar y porque se efectúa el calentamien
to a una temperatura comprendida entre 50°C y 64°C. - - - - -

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte
rizado porque se efectúa la termocoagulación durante por lo
menos 30 minutos. - - - - -

416597



3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se efectúa la termocoagulación entre 56°C y 60°C. - - - - -

5. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el contenido en proteínas de la solución es del orden de 20g/litro. - - - - -

5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la termocoagulación se efectúa en presencia de caprilato de sodio. - - - - -

10. 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se aumenta el pH cuando se aumenta la proporción de caprilato con respecto a las proteínas. - - - - -

15. 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en particular para una solución que proviene de placenta, de sangre placentaria o de sangre hemolizada, caracterizado porque se hace preceder la termocoagulación por una por lo menos de las etapas que consisten en eliminar la mayor parte de la hemoglobina, en eliminar los enzimas tales como las fosfatasa alcalinas por precipitación de las proteínas con ayuda de un ácido tal como el ácido tricloroacético o los ácidos polifosfóricos y en eliminar las sustancias de grupo. - - - - -

20. 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracte

416597



terizado porque se efectúa la eliminación de la hemoglobina en presencia de una concentración de etanol inferior al 60% con adición de un hidrocarburo halogenado, en particular cloroformo. - - - - -

5. 9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado porque se eliminan los enzimas en presencia de una concentración de etanol inferior al 60% con adición de ácido tricloroacético. - - - - -

10. 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la concentración de ácido tricloroacético está comprendida entre 3 y $10 \cdot 10^{-2}$ M/litro. - - - - -

15. 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque se eliminan las sustancias de grupo con una concentración de etanol superior al 55% adicionando ácido tricloroacético a una temperatura inferior a 0°. - - - - -

12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque se efectúa una clarificación de la solución con la ayuda de un gel de sílice. - -

20. 13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque después de la termocogulación se efectúa la separación del precipitado por centrifugación y filtración del sobrenadante. - - - - -

14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindi

416597



caciones 1 a 13, caracterizado porque después de la termo-
coagulación, la solución de albúmina es concentrada por pre-
cipitación por adición de etanol. - - - - -

5. 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, ca-
racterizado porque el precipitado es redisolto, siendo en-
tonces la solución dializada y después tratada sobre gel de
alúmina. - - - - -

10. 16.- Procedimiento según la reivindicación 15, ca-
racterizado porque se efectúa seguidamente una concentración
bajo vacío y una filtración esterilizante. - - - - -

17.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ALBUMINA PURI-
FICADA". - - - - -

15. Todo ello conforme se describe y reivindica en la
presente memoria que consta de dieciocho hojas, foliadas y
mecanografiadas por una sola de sus caras, y de tres láminas
de dibujos que la ilustran.

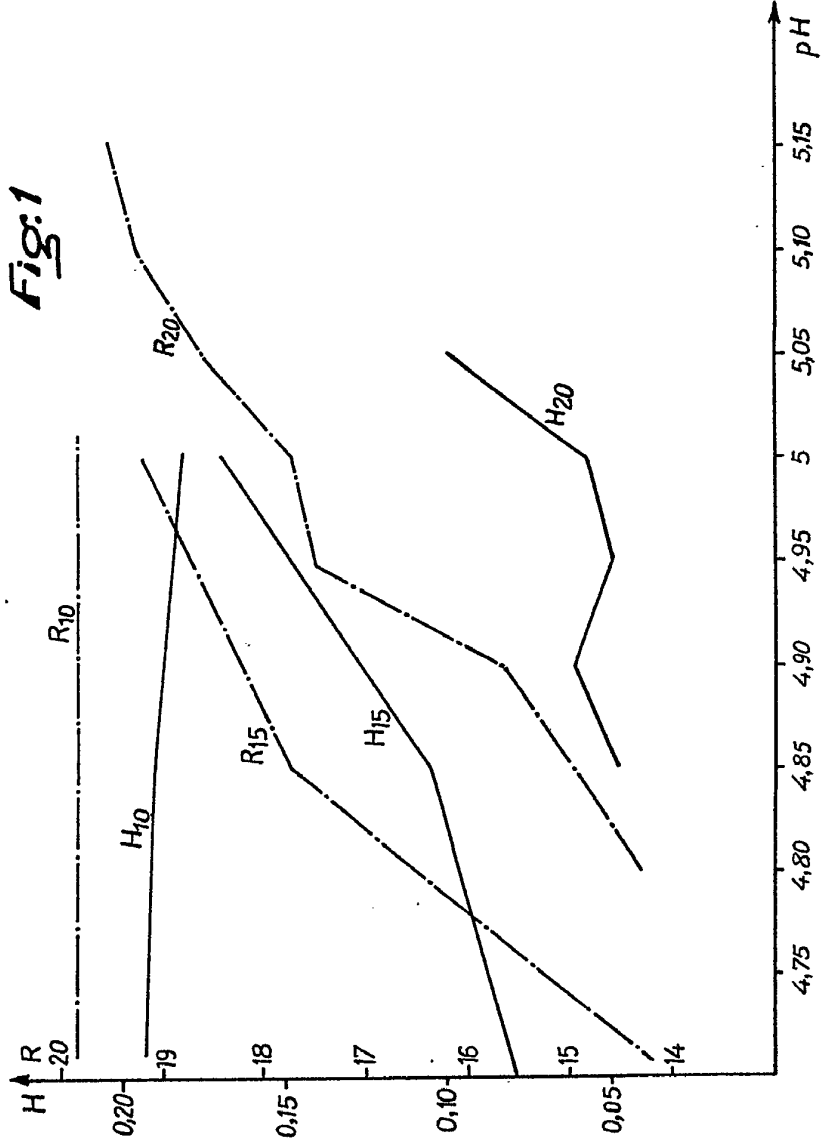
MADRID, 5 JUL 1973
P. A. M. CURELL SUÑOL

M. A. M. C.

mcm.

416597

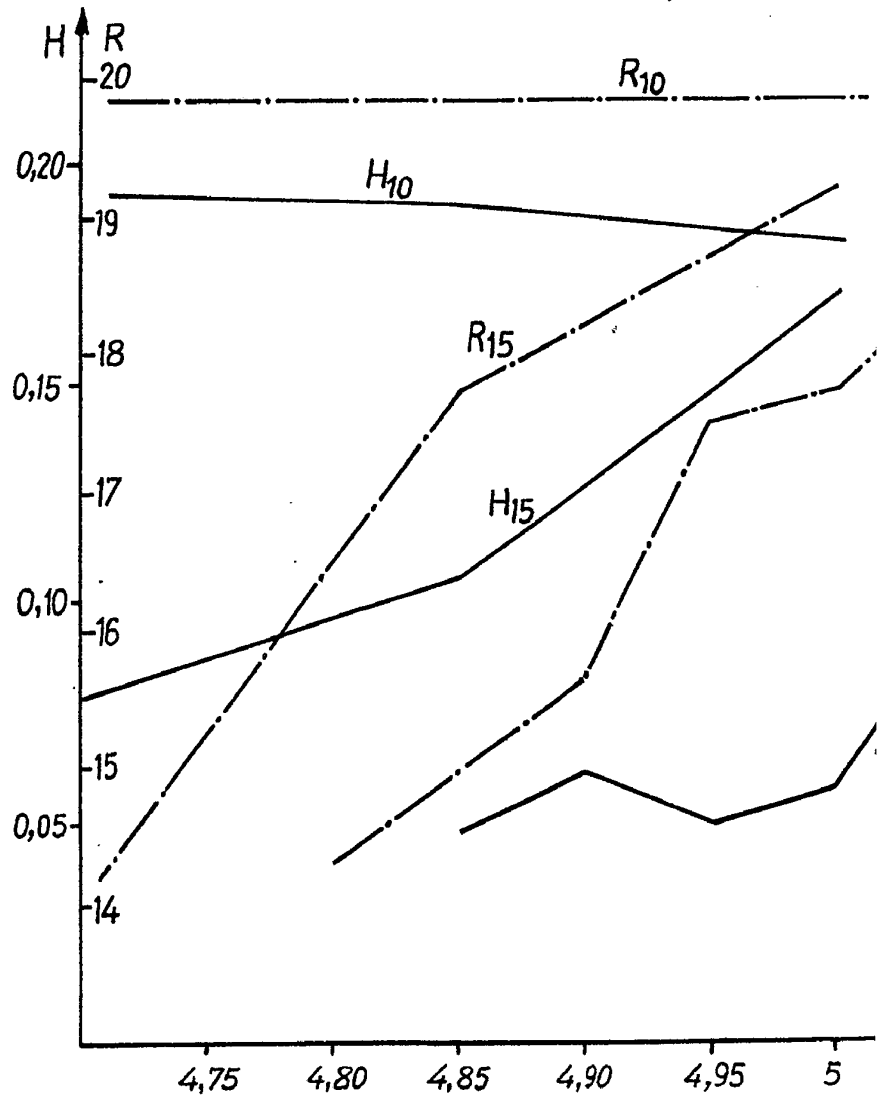
416597



MADRID

Man. h. h.

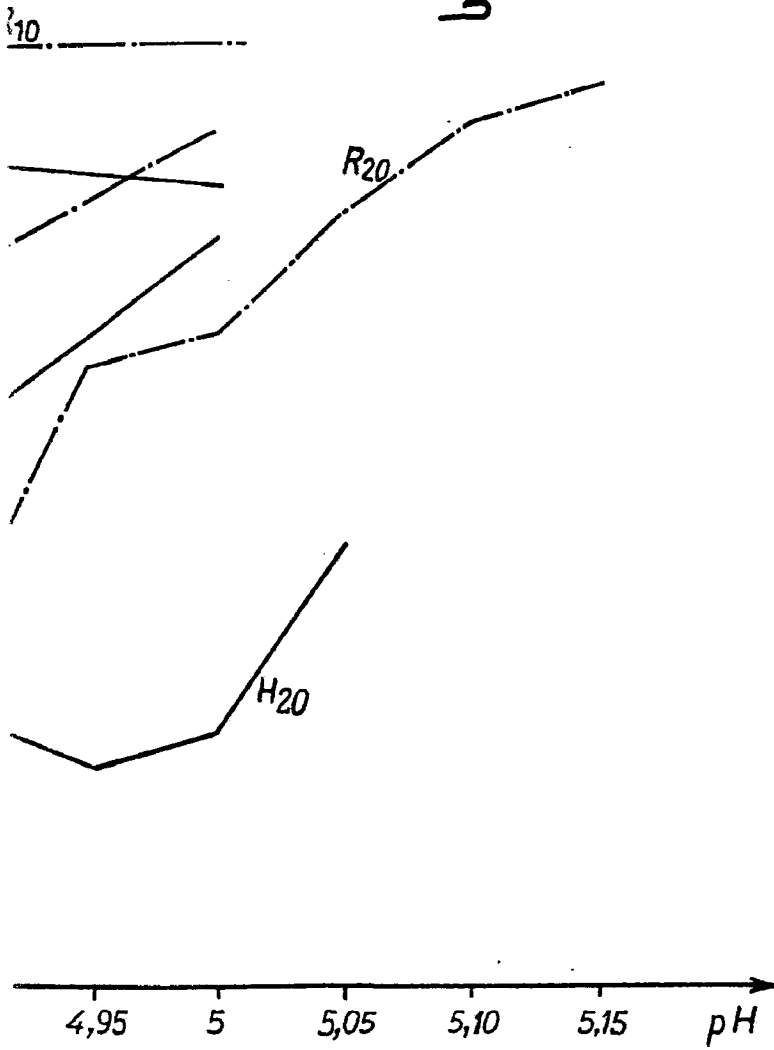
416597



416597



Fig.1



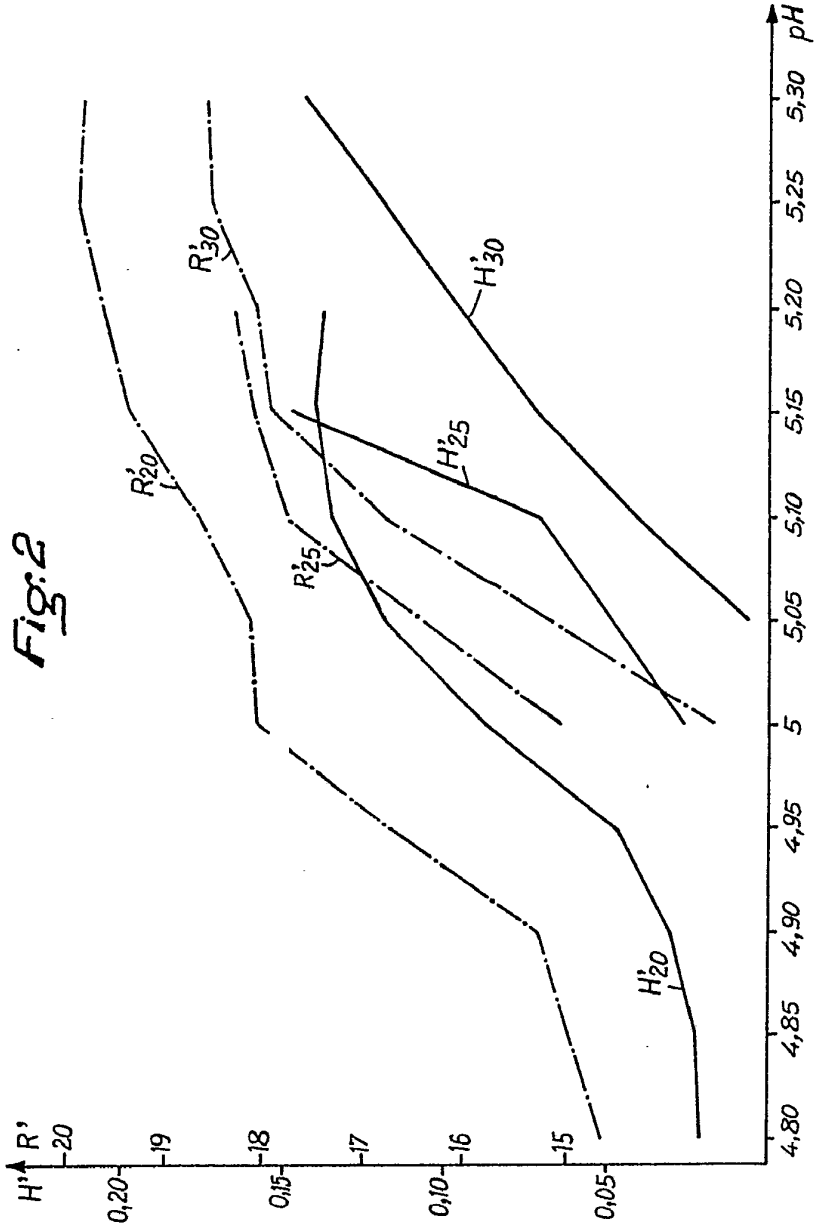
MADRID

F. A. ...

Man. ...

416597

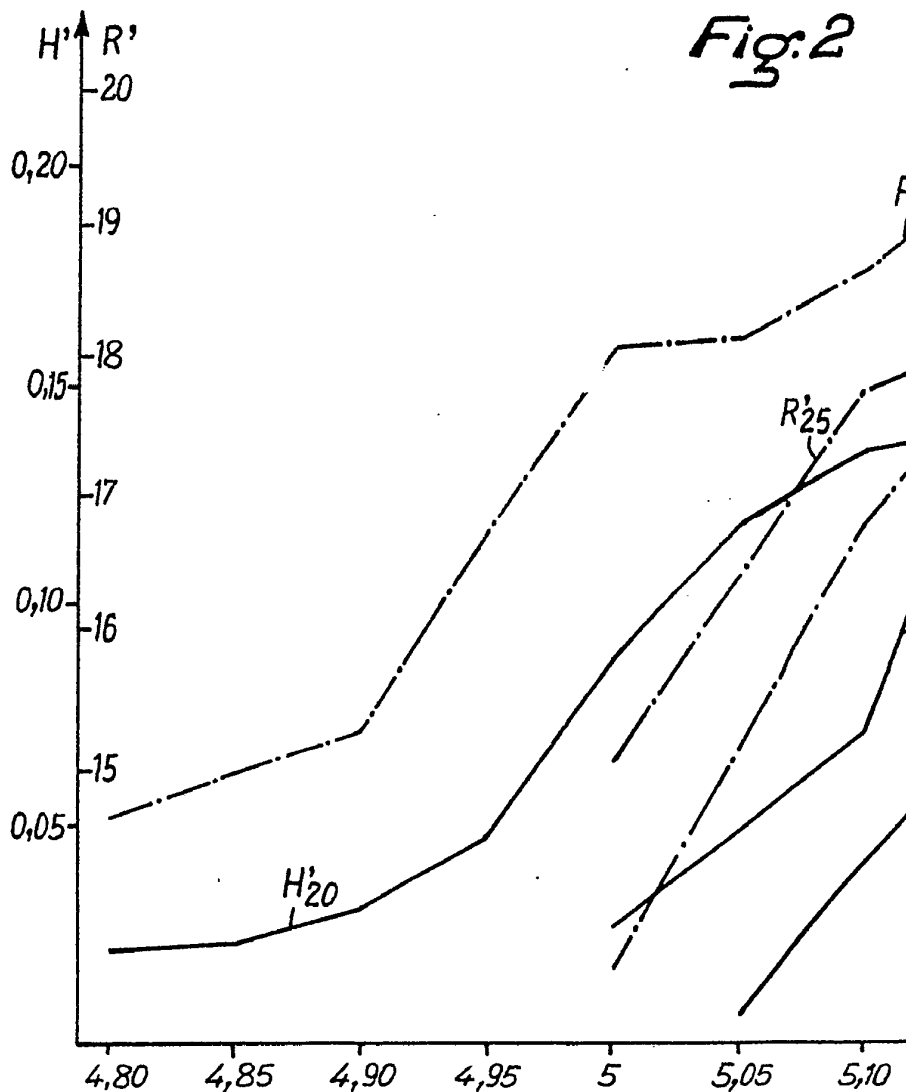
416597



MARTELL

Ma. h. d.

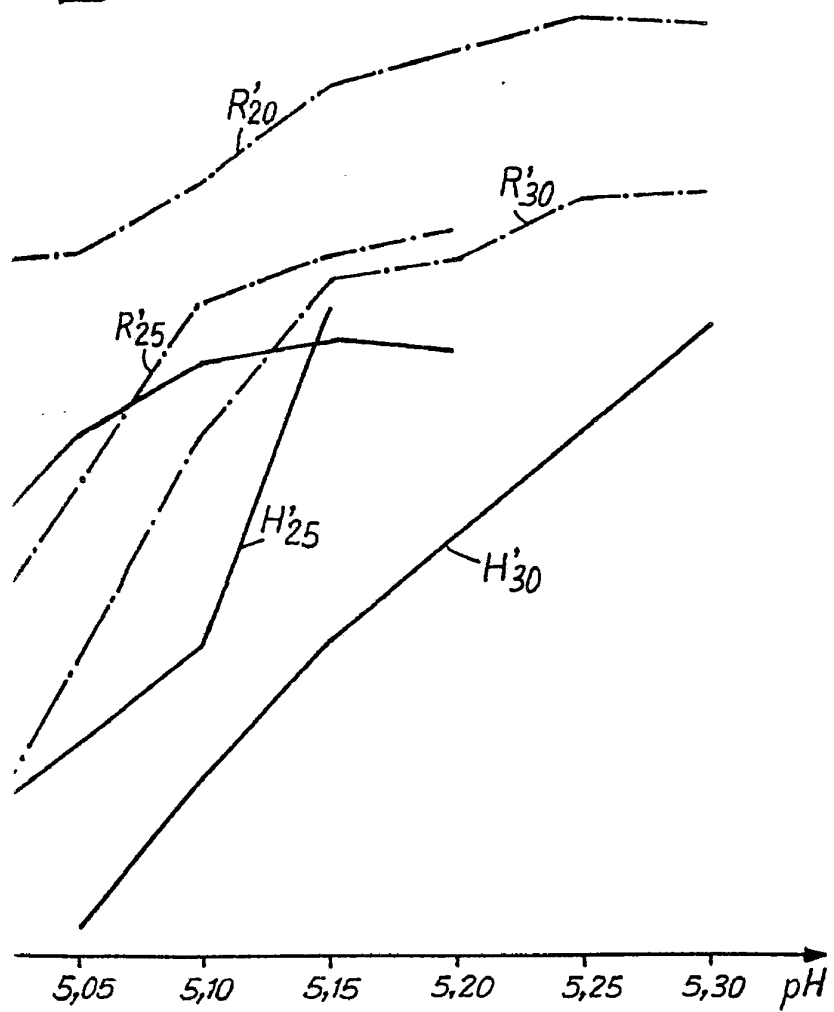
416597



416597



Fig. 2



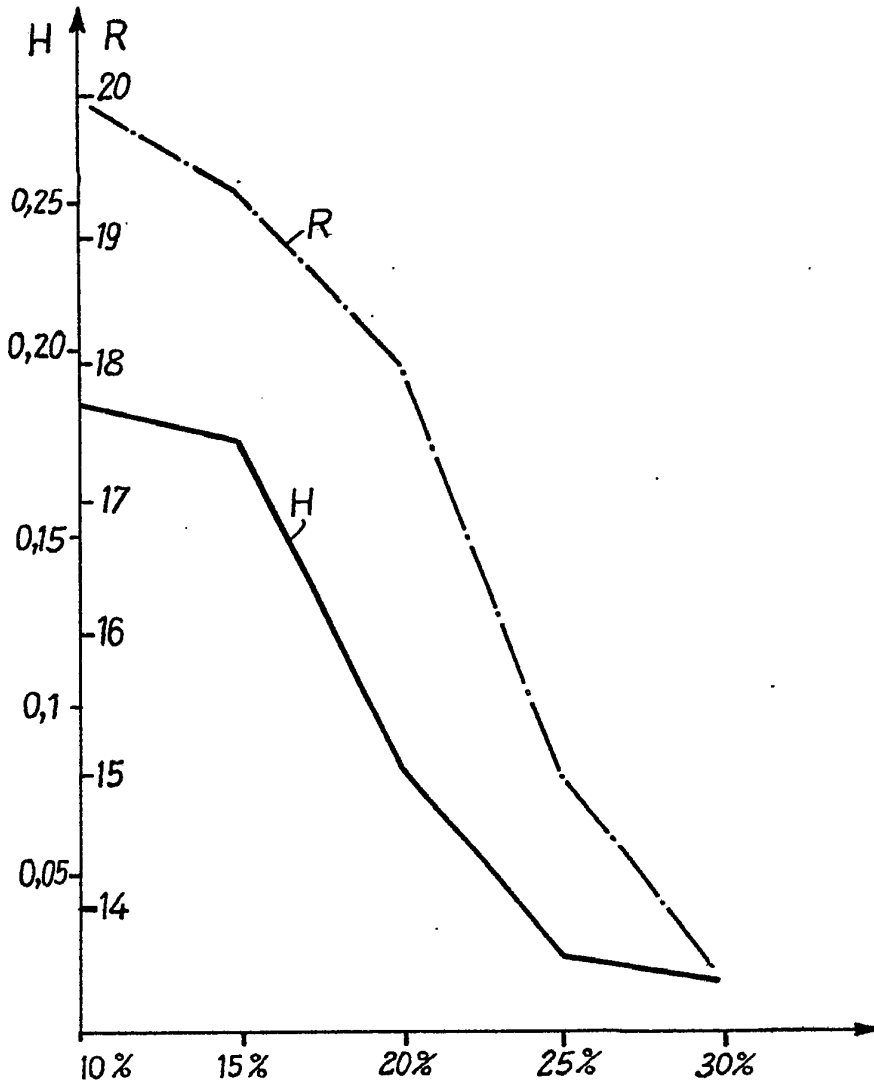
MADRID, 1973

Man. L. de

416507



Fig. 3



MADRID, 1973

P. A. M. CURELL SUÑOL

Man. In d.