



Int. Cl.: COFG//A61K

#1/995

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a una PATENTE DE INVENCION por "Procedimiento para la obtención de Inmunoglobulina A humana con baja proporción de Inmunoglobulina G¹", a favor de Laboratorios Hubber, S.A., entidad española, con domicilio en Barcelona, calle Berlín, 38.

2.



Conforme se indica en el enunciado, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la obtención de Inmunoglobulina A humana con baja proporción de Inmunoglobulina G, y más concretamente a un procedimiento que, eludiendo la diálisis, permite la preparación de Inmunoglobulina A, substancia conocida también como IgA, γ A Inmanoglobulina, γ 1A Globulina, β 2A Globulina, β X Globulina.

La inmunoglobulina A es una proteína del plasma humano, para el aislamiento de la cual se han seguido diferentes caminos basados en la solubilidad de Inmunoglobulinas en presencia de iones zinc y electroforesis preparativa o bien asociándolo con cromatografía sobre diversas resinas, etc., usando en algunos casos precipitación con sulfato amónico. Tomando como partida la Fracción III de Cohn se han seguido otros métodos con absorción sobre Al_2O_3 y diferentes pasos en los que se asocia uno o varios métodos de los anteriormente descritos. En estos métodos era necesario el manejo de grandes volúmenes, tanto de partida como durante el proceso, y el uso de la diálisis.

La dificultad de preparación y purificación de dicha inmunoglobulina radica principalmente en el bajo contenido de ésta en el plasma y el gran parecido en propiedades físico-químicas que tienen las tres principales inmunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM).

El método que se ha seguido consiste básicamente en:

1. Eliminación de la mayor parte de las proteínas no IgA, mediante dos etapas:

1a.- Dispersión de la Fracción III en un medio acuoso con pH apropiado y con baja fuerza iónica,

2a.- Eliminación de las proteínas no inmunoglobulinas (y parte de la IgM)

basada en el cambio de la constante dieléctrica del medio con ácido caprílico y en las condiciones de pH y fuerza iónica apropiadas.

2. Eliminación del resto de inmunoglobulinas mediante dos etapas:

I.- Eliminación de la mayor parte de IgG mediante absorción de las otras inmunoglobulinas sobre resina aniónica (DEAE - celulosa) en condiciones de pH y fuerza iónica determinadas,

II.- Eliminación del resto de IgM mediante elución de la resina en columna



con tampón y en condiciones de trabajo: caudal, pH, apropiados y recogiendo la fracción deseada.

- En el paso de la etapa 2a a II se precisa una disminución de la fuerza iónica, por lo que se necesitaría realizar una diálisis o aumentar el volumen, con las consiguientes pérdidas de producto y tiempo en el proceso de diálisis o gran dilución de la proteína y volúmenes incómodos de manejar.

- Para intentar evitar los inconvenientes expuestos en el punto anterior, se utilizó un método basado en las propiedades de absorción selectiva de los dextranos modificados, tipo Sephadex^R. Eligiendo el tipo de Sephadex^R apropiado, se puede concentrar la disolución sin pérdida de las macromoléculas y sin cambiar el pH y fuerza iónica del medio.

Se eligió el Sephadex^R G-25 Coarse, por las siguientes razones:

- 1^a, El hinchado de este tipo de dextrano se realiza en forma rápida, con la consiguiente ganancia de tiempo y evitación de la posible desnaturalización de la proteína,
- 2^a, Es fácil y cuantitativamente separable del concentrado obtenido,
- 3^a, Es insoluble, por lo que no contamina el concentrado,
- 4^a, Prácticamente no absorbe proteína,
- 5^a, De los diferentes tipos de Sephadex es el más económico,
- 6^a, Es fácilmente recuperable para un nuevo uso.

Después de lo que se ha expuesto hasta aquí, puede ya pasarse a una referencia directa del procedimiento objeto de la actual invención, haciéndolo a través de un ejemplo concreto, en las diversas fases y condiciones que lo afectan.

- Se disgregan 300 gramos de Fracción III, obtenida según el procedimiento de Cohn, en 1,2 litros de agua destilada a una temperatura de unos 4^o. Se lleva la suspensión a pH = 5,7 con NaOH 0,2N. Se enfría a 4^o y se agita continuamente durante 24 horas. A la disolución sobrenadante se le añade acetato sódico sólido hasta obtener fuerza iónica I= 0,03. Se ajusta con ácido acético 1M hasta pH= 4,8. La disolución se lleva a una temperatura de 20^o. Se añade gota a gota Acido

4.



caprílico en la proporción de 2,5 gramos del mismo por gramo de proteína presente. Se agita durante una hora manteniendo la misma temperatura.

Se centrifuga o deja reposar y filtrar por papel poco absorbente. Se decanta. Al sobrenadante se añade poco a poco y agitando suavemente,

5. 400 gramos de Sephadex^R G-25 Coarse. Se continúa agitando durante 10 minutos, suavemente, pero en toda la masa. Se filtra por filtro poco absorbente. El gel hinchado que queda en el filtro, se lava con pequeñas proporciones de agua destilada que se unen al filtrado. El filtrado se ajusta a pH= 5,7 con NaOH 0,05N. Se comprueba la conductividad y se
10. añade agua destilada hasta que se tenga una disolución con fuerza iónica equivalente a la de un tampón acetato-acético 0,015M, pH= 5,7 (conductividad específica aproximadamente igual a $1,08 \cdot 10^{-3}$ mhos).

A la disolución resultante se añaden 20 gramos de resina tipo dietilamino-etil-celulosa, previamente equilibrada con tampón acetato/acético

15. 0,015M pH= 5,7 y posteriormente escurrida. Se agita 30 minutos y se filtra por papel poco absorbente. La resina que queda en el filtro se lava repetidas veces con tampón acetato/acético 0,015M, pH= 5,7 hasta que no se encuentran proteínas en el lavado, con lo que se habrá eliminado la mayor parte de IgG.

20. La pasta de resina, bien escurrida, se añade a una pequeña cantidad de tampón acetato/acético 0,015M, pH= 5,7 se homogeniza bien y se introduce en columna (superficie de la sección de la columna = 5,3 cm²). Se pasa una pequeña cantidad del mismo tampón anterior hasta conseguir perfecta estabilización. Después, se eluye la resina con tampón acetato/acético
25. 0,09M, pH= 5,7 y a un caudal de unos 2-3 ml/minuto. Se recoge la primera fracción (unos 20-30 ml) que corresponde a la IgA.

Posteriormente, es necesaria una operación de desalado valiéndose de resina Sephadex G-25, consiguiéndose una disminución de la cantidad de sales de 1/100 - 1/1000 de la concentración inicial.

30. En dicha solución se efectúan análisis inmunolectroforéticos frente a antisuero humano total, Antisuero Anti IgA (cadena α), Antisuero Anti IgG



5.

(cadena γ) y Anti IgM (cadena μ), detectándose solamente IgA.

Se efectúa cuantificación de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial con placas preparadas, dando por resultado, en porcentaje sobre las inmunoglobulinas totales: IgA, 80/85%; IgG 10/15%; IgM no se detecta.

5. Esta solución puede liofilizarse para su mejor conservación, y, operándose estéril y apirogénicamente, emplearse para uso clínico.

No obstante lo hasta aquí expuesto, el actual procedimiento será variable en cuantas circunstancias no afecten o alteren su esencialidad, que es la que se concreta en la reivindicación que sigue.

10. N O T A.

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

REIVINDICACIONES.


1. Procedimiento para la obtención de Inmunoglobulina A humana con
15. baja proporción de Inmunoglobulina G, caracterizado por partir de una masa de tres unidades de peso de Fracción III obtenida según el método de Cohn, la cual masa se disgrega en agua destilada, en una proporción de 0,4 litros por cada 100 gramos de Fracción III, a unos 4^º, llevándose la suspensión a pH igual a 5,7 con NaOH 0,2 N y enfriándose a 4^º,
20. con agitación continua durante unas veinticuatro horas, con ulterior centrifugación a la misma temperatura, y añadiéndose a la disolución sobrenadante acetato sódico sólido hasta obtener fuerza iónica I= 0,03 ajustándose luego con ácido acético 1M hasta pH= 4,8 llevándose la disolución a una temperatura de 20^º, añadiéndose gota a gota ácido caprí-
25. lico en la proporción de 2,5 gramos por gramo de proteína presente, agitándose durante una hora a la misma temperatura, para luego centrifugarse o dejarse reposar y filtrarse por papel poco absorbente, y decantándose, y añadiéndose al sobrenadante, poco a poco y agitando suavemente, cuatro unidades de peso de Sephadex^R G-25 Coarse, para continuar agitando durante unos diez minutos, suavemente pero en toda la ma-
30. sa, filtrándose por filtro poco absorbente, resultando un gel hinchado



6.

- que permanece en el filtro y que se lava con pequeñas porciones de agua destilada, que se unen al filtrado, el cual es ajustado a pH igual a 5,7 con NaOH 0,05M comprobándose la conductividad y añadiendo agua destilada hasta que se tenga una disolución con fuerza iónica equivalente a la de un tampón acetato acético 0,015M, pH= 5,7 (conductividad específica aproximadamente igual a $1,08 \cdot 10^{-3}$ mhos), y
5. añadiéndose a la disolución resultante dos décimos de unidad de peso de resina tipo dietilamino-etil-celulosa, previamente equilibrada con tampón acetato/acético 0,015M pH= 5,7 y posteriormente escurrida,
10. agitándose treinta minutos y filtrándose por papel poco absorbente, quedando en el filtro la resina que se lava repetidas veces con tampón acetato/acético 0,015M pH= 5,7 hasta que no se encuentren proteínas en el lavado, con lo que se habrá eliminado la mayor parte de IgG, y añadiéndose la pasta de resina, bien escurrida, a una pequeña cantidad de tampón acetato/acético 0,015M, pH= 5,7 que se homogeniza bien
15. y se introduce en columna con superficie de sección en $5,3 \text{ cm}^2$, pasándose una pequeña cantidad del mismo tampón anterior hasta conseguir perfecta estabilización, para después eluirse la resina con tampón acetato/acético 0,09M, pH= 5,7 y a un caudal de unos 2-3 ml/minuto,
20. recogiendo la primera fracción, que corresponde a la IgA, siendo necesaria una siguiente operación de desalado por medio de resina Sephadex G-25, para conseguir una disminución en la cantidad de sales de $1/100 - 1/1000$ de la concentración inicial, y realizándose en la solución análisis inmunoelectroforéticos, para detectarse sólo IgA, y
25. finalmente efectuándose cuantificación de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial con placas preparadas, lo cual da por resultado IgA 80/85% e IgG 10/15%.

2. Procedimiento para la obtención de Inmunoglobulina A humana con baja proporción de Inmunoglobulina G.

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

7.



una sola de sus caras.

Barcelona a tres de agosto de mil novecientos setenta y tres.

LABORATORIOS HUBBER, S. A.
Director General

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, positioned to the right of the typed name and title.

