

434 100

26 FEB. 1975

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: C07G, A61K

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

A nombre de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en 6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION O EL ENRIQUECIMIENTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS IgG, IgA E IgM A PARTIR DE SUERO O DE PLASMA"
(Clase Internacional A61k)

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de inmanoglobulinas, en especial a un procedimiento para la obtención de concentrados de inmunoglobulinas que por una parte contienen IgG ampliamente pura, por otra parte, junto a IgG, contienen IgA o IgM fuertemente enriquecidas.

En la defensa inmunológica del cuerpo frente a microorganismos y a los productos del metabolismo de éstos, las inmunoglobulinas desempeñan un papel importante como anticuerpos humorales. Sin embargo, las inmunoglobulinas no son homogéneas; se diferencian no sólo respecto a su constitución química, a su peso molecular y a su presencia cuantitativa en el suero, sino también porque, por ejemplo, en la fracción designada como inmunoglobulina A (IgA) se encuentran elevadas actividades como anticuerpos contra determinados virus, por ejemplo contra la poliomielitis, el sarampión y la gripe.

En la fracción de la clase M de inmunoglobulinas (IgM) se encuentran predominantemente los anticuerpos frente a agentes patógenos gramnegativos, por ejemplo anticuerpos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (*Bact. pyocyaneum*), *B. proteus*, *Haemoph. Influenza*, *H. pertusis*, *Klebsiellas* (*Klebs. pneumoniae*), *Salmonellas* y *Shigellas*. Por lo general, los anticuerpos frente a hidratos de carbono han de ser encontrados de

preferencia como Igm, mientras que los antígenos proteí-
nicos inducen en lo esencial la formación de las inmu-
globulinas de la clase G (IgG). De ello hay que deducir
que una inmunoterapia avanzada de infecciones bacteria-
5 nas y virales requiere una sustitución específica y una
utilización atinada de inmunoglobulinas de las clases que
tienen una importancia esencial para el cuadro de enfer-
medades.

Para la obtención de la inmunoglobulinas,
10 separadas por clases, se dispone de dos procedimientos
conocidos; por una parte el procedimiento de precipita-
ción con etanol, debido a Cohn y Oncley, desarrollado pos-
teriormente en la memoria de la patente de los Estados
Unidos 3.597.409; por otra parte, el método de Heide y
15 Haupt, que utiliza la combinación de las etapas de preci-
pitación con derivados de acridina y con sulfato de amo-
nio. En especial el método mencionado en último término
necesita además con frecuencia de etapas electroforéticas
y cromatográficas para la separación y purificación pos-
20 terior de las fracciones enriquecidas de inmunoglobulinas.
Por ello el método tiene muchas pérdidas y, en el caso de
su utilización a escala técnica, conduce a resultados in-
satisfactorios.

Los preparados comerciales de inmunoglobu-
25 linas, producidos según la situación actual de la técnica,

contienen principalmente sólo IgG, poco de IgA y sólo vestigios de IgM.

Se ha encontrado ahora un procedimiento para la preparación de concentrados de inmunoglobulinas separadas por clases, que contienen IgA, IgM e IgG en elevada pureza y buen rendimiento. Por consiguiente, es objeto de la presente invención un procedimiento para la obtención de inmunoglobulinas o de concentrados de inmunoglobulinas, que por una parte contienen IgG sensiblemente pura, y por otra, junto a la IgG, contienen IgA o IgM fuertemente enriquecidas. El procedimiento está caracterizado porque:

- a) a partir de suero o de plasma desfibrinado se precipita, con un alcohol primario de cadena corta, una fracción bruta de inmunoglobulinas,
- b) el precipitado de la etapa (a) se lleva a un estado de solución acuosa, y de ella se precipitan las euglobulinas por ajuste de una conductividad baja y de un valor del pH débilmente ácido,
- c) de la porción sobrenadante de la etapa (b) se separan los fermentos proteolíticos por adsorción en un adsorbente mineral,
- d) en la porción sobrenadante de la etapa (c) se adsorbe la parte predominante de la IgM, junto a otras proteínas, en un fosfato difícilmente soluble, y se

separa el adsorbato,

- e) del adsorbato de la etapa (d) se desorbe una fracción que contiene Igl₁, y la Igl₁ se enriquece por precipitación con un alcohol primario de cadena corta,
- 5 f) el precipitado de la etapa (e) se lleva al estado de solución acuosa, se mezcla con hidróxido de aluminio para la eliminación de impurezas, y se separa de nuevo aquél,
- g) de la porción sobrenadante de la etapa (d), liberada de Igl₁ por adsorción, se precipitan las IgG y la IgA con un alcohol primario de cadena corta, y
- 10 h) en el caso de que se desee, para la separación de la IgG y de la IgA, la IgA se adsorbe selectivamente en hidróxido de aluminio.

15 Objeto de la presente invención son además los concentrados de inmunoglobulinas enriquecidos en lo que se refiere a IgA, Igl₁ e IgG, preparados según el procedimiento, su utilización como agente terapéutico y como reactivos para diagnosis, así como preparados que

20 contienen las inmunoglobulinas mencionadas.

La eliminación del fibrinógeno del plasma que sirve como material de partida se realiza de modo en sí conocido, ventajosamente por precipitación con un alcohol inferior o también por recalificación o por crio-

25 precipitación.

La separación de las fracciones brutas de inmunoglobulina en la etapa (a) se realiza de preferencia por medio de etanol con una concentración entre 18 y 35% de preferencia de 25%, en un intervalo de pH de 5, 6 a 5 8, 5, de preferencia a 7,7, a una temperatura de 0 a -10°C, de preferencia -5°C. En lugar de etanol puede ser empleado aquí, como también en las siguientes etapas del procedimiento, cualquier otro alcohol alifático primario de cadena corta, siempre que sea suficientemente miscible 10 con agua, por ejemplo metanol. Sin embargo se prefiere el etanol a causa de su compatibilidad fisiológica.

Correspondiendo a la etapa (b), el precipitado de la etapa (a) se lleva al estado de solución acuosa en una cantidad de 5 a 50 veces, ventajosamente en una 15 cantidad de 20 veces, el peso del precipitado, de preferencia de agua destilada. Al agua pueden ser añadidos, si así se desea, aditivos adecuados tales como aminoácidos, de preferencia glicina, en pequeña concentración. Acto seguido se ajusta la conductividad por adición de una 20 sal, ventajosamente cloruro de sodio, a $5,0 \times 10^2$ hasta $8,0 \times 10^3$ μ S (S = Siemen). Por acidificación a pH de 4,5 a 6, de preferencia a pH 5, 1, se separan por precipitación las euglobulinas en el intervalo de temperaturas de 0 a + 20°C, de preferencia a + 5°C.

25 Para la absorción de proteinasas, en espe-

cial de plasminógeno, a la porción sobrenadante de la etapa (b), liberado de euglobulinas, se le añade un adsorbente mineral, de modo especialmente ventajoso silicatos, por ejemplo caolín o la atapulgita obtenible en el comercio y designada con el nombre Pharmasorb - Regular, en una cantidad de 0,3 a 1 %, de preferencia 0,7 % (peso: volumen), con una conductividad de $5,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^4$ μ S, de preferencia de $6,0 \times 10^3$ μ S, a un valor de pH de 4,5 a 6,5, de preferencia a pH 5,5, y se deja actuar durante 30 minutos a 3 horas.

Después de separación del adsorbente por centrifugación o por filtración, al producto decantado se le añade una sal de calcio soluble en agua y un fosfato soluble en agua, debiendo estar presente la sal de calcio en exceso con respecto al fosfato, de preferencia en un exceso molar de tres veces. Se utilizan ventajosamente fosfato secundario de sodio y acetato de calcio. La concentración de la sal de calcio debe ser aproximadamente 0,025 a 0,1 molar, ventajosamente 0,07 molar. A continuación se ajusta el valor del pH de 5,8 a 8,5, de preferencia a 7,9, con lo que el fosfato de calcio que se forma adsorbe la IgM.

La fracción adsorbida que contiene IgM, después de separación del fosfato de calcio por centrifugación o por filtración, se cluye por tratamiento con 5 a 10

veces su volumen de una solución acuosa de una sal, ven
tajosamente una solución de cloruro de sodio, ajustada
a un pH de 4,0 a 8,0 de preferencia a pH 5,0, cuya con-
centración es de 0,8 a 4 %, o con una solución de un ami-
5 noácido, ventajosamente una solución de glicina, cuya
concentración es de 1 a 8 %, o con una solución acuosa
de un agente formador de complejos con calcio, ventajo-
samente con sales de metales alcalinos del ácido etilen-
-diamino-tetraacético en una concentración de 2 a 7 %,
10 de preferencia de 4,5 %, o con una combinación adecuada
de sal, aminoácido y agente formador de complejos.

Del eluato que contiene IgM, se precipita la
IgM después de ajustar el valor del pH a pH de 5,0 a 8,0, de
preferencia a pH 7, por adición de un alcohol primario de
15 cadena corta, ventajosamente por adición de etanol, hasta
una concentración de aproximadamente 20 a 25 %.

El precipitado de la etapa (e), separado
por centrifugación o por filtración, se disuelve de nue-
vo en la menor cantidad posible de una solución acuosa
20 diluida de sal, de preferencia una solución de cloruro
de sodio al 0,3 - 0,75 %, se ajusta el valor del pH de
4,5 a 5,5, y se ajusta la conductividad por adición de
una sal, de preferencia cloruro de sodio (sal común),
a algo más de 1×10^4 μ S. A continuación, las impure-
25 zas de la fracción enriquecida con IgM se adsorben por

adición de 0,1 a 0,3 % de un gel de $Al(OH)_3$ (calculado como Al_2O_3) y con ello, después de la separación del adsorbente, se obtiene con buen rendimiento una solución que contiene IgM.

5 De la porción sobrenadante de la adsorción con fosfato de calcio de la etapa (d) se precipitan la IgG y la IgA con un alcohol primario de cadena corta, ventajosamente con etanol, en una concentración de 20 a 40 %, de preferencia de 25 %, a pH de 6,5 a 8,0, de preferencia de 6,8, entre 0 y $-10^{\circ}C$, de preferencia a $-5^{\circ}C$.

10 La separación de IgG y de IgA, después de la disolución del precipitado obtenido con etanol, en agua o en una solución diluída de sal en una cantidad tal que la concentración de proteínas de la solución sea de aproximadamente 1 %, se realiza a pH 4,5 a 5,5, de preferencia a pH 5,0, y con una conductividad algo mayor de $1 \times 10^4 \mu S$, por adición de 0,05 a 0,2 %, de preferencia de 0,1 % de un gel de $Al(OH)_3$ (calculado como Al_2O_3).
15 En estas condiciones la IgA se adsorbe, mientras que la IgG permanece en la porción sobrenadante. La IgA contenida en el adsorbato, después de separación de un modo en sí conocido, se desorbe ventajosamente con una solución 1/3 M de fosfato secundario de sodio.

20 La IgA y la IgG pueden ser también separadas una de otra de modo conocido por procedimientos de

precipitación, por cromatografía o por electroforesis de zonas.

5 Cuando esto parece deseable y necesario, las pastas de inmunoglobulinas IgA e IgG, obtenidas por precipitación con alcohol en la etapa (g), pueden ser liberadas del alcohol por liofilización. La eliminación del agente precipitante de las inmunoglobulinas puede realizarse también por filtración a través de gel o por diálisis de la solución de inmunoglobulinas.

10 Si así se desea, a los productos finales se les puede añadir un agente bacteriostático. La IgA y la IgG pueden ser conservadas en estado desecado por congelación y ser disueltas de nuevo del modo conocido para inmunoglobulinas, por ejemplo en solución de cloruro de sodio al 0,3 por ciento o en solución de glicina al 2,25
15 por ciento.

20 La pureza y el rendimiento de las inmunoglobulinas se determina con la técnica de inmunodifusión radial según Becker, Rapp, Schwick y Störko, Z. Klin. Chem. 6, 113 (1968).

Los preparados de IgM, IgA e IgG, producidos según la invención, son inmunoglobulinas con una pureza de 95%, según los criterios de la electroforesis.

25 Según la presente invención se obtiene un preparado nativo de IgM con una pureza que consiste en

5 hasta 70 % de IgM y un contenido restante principalmen-
te de IgG y pequeñas cantidades de IgA. El rendimiento
es de hasta 30 % del contenido original de IgM en el
plasma. A causa de la elevada viscosidad de las solu-
ciones de IgM obtenidas según el procedimiento, se re-
comienda, antes de la utilización posterior, una dilu-
ción con una solución acuosa de una proteína de plasma,
de preferencia con una solución de inmunoglobulina que
10 contiene IgG, a un contenido de aproximadamente 20 % de
IgM referido al contenido total de proteínas. La mezcla
de IgG y de IgA obtenida antes de la última etapa de se-
paración (final de la etapa (g)) se compone de aproxima-
damente 85% de IgG y 15% de IgA. En tal caso se recupe-
ran la IgA con un rendimiento de 60%, y la IgG con un
15 rendimiento de 90% -referidos a las cantidades de inmu-
noglobulina contenidas en el plasma de partida.

La separación de IgG y de IgA según la in-
vención proporciona concentrados que, por una parte con-
tienen aproximadamente 40-50% de IgA con el contenido res-
tante de IgG, y por otra parte contienen una IgG prácti-
camente pura. La separación de IgG y de IgA por procedi-
mientos conocidos para la obtención de la IgA, por ejem-
plo por la electroforesis de zonas, esencialmente más cos-
tosa, no proporciona una separación más amplia que el pro-
20 cedimiento según la invención.
25

Estos productos finales del procedimiento se presentan exentos de pirógenos y, en el caso de la utilización de plasma que contiene antígeno Australia, también exentos del antígeno Australia reconocible en la electroforesis de supermigración.

5

Junto a los rasgos esenciales mostrados del procedimiento, el experto está libre para introducir diferentes variaciones. En especial no es indispensablemente necesario preparar según el presente procedimiento todas las inunoglobulinas IgA, IgM e IgG a obtener según la invención. Por ejemplo, puede ser aislada por este procedimiento sólo IgM, pero la separación de las demás inmunoglobulinas se podría realizar por otros métodos, en especial si se está dispuesto a aceptar pérdidas de rendimiento en interés de un tratamiento simplificado.

10

15

Para la obtención de la IgM con buen rendimiento, en lugar de la propuesta adsorción de las impurezas mediante gel de $Al(OH)_3$, se puede utilizar también, por ejemplo, una precipitación, a realizar en el mismo medio, con un alcohol inferior, ventajosamente etanol, en una concentración de 10-20%, ventajosamente de 15%, de 0 a $-10^{\circ}C$, ventajosamente a $-5^{\circ}C$.

20

La desorción selectiva puede realizarse, por una parte, por elevación de la conductividad de la solución de elución, por otra por una formación parcial

25

de complejo de la solución de elución con el adsorbente, o por una combinación adecuada y conveniente de ambos procedimientos.

5 La presente invención utiliza con ventaja agentes no tóxicos o fisiológicamente bien tolerables. Así se utiliza ventajosamente el etanol en lugar del metanol, puesto que el último, como es sabido, es tóxico. Sin embargo, las precipitaciones para el enriquecimiento pueden llevarse a cabo tanto con etanol como con metanol
10 o con isopropanol. Puesto que el cloruro de sodio se utiliza desde hace decenios como componente de las soluciones para infusión, se usa de preferencia el cloruro de sodio para la elevación de la conductividad de las soluciones. Sin embargo, el experto está libre de elegir para
15 este fin otra sal soluble en agua.

Como material de partida sirve ventajosamente plasma humano recién obtenido, estabilizado con ácido cítrico y glucosa (ACD) o con ácido cítrico, glucosa y fosfato (CPD), que contiene las inmunoglobulinas en una distribución normal. Sin embargo, se puede utilizar también plasma
20 ma inmune, es decir plasma de donantes a los que, para la consecución de una elevada concentración de anticuerpos, se habían administrado determinados antígenos. Además, del plasma recientemente obtenido se puede usar también
25 plasma congelado. Por la ventaja especial del procedimiento

to según la invención, de que los productos finales son
obtenidos exentos de pirógenos, puede ser también empleado
do como materiales de partida un plasma ya contaminado
microbianamente y sobreenviejecido. No son necesarios
5 aditivos antibacterianos en la etapa de tratamiento. Si
antes de la utilización del procedimiento son procuradas
condiciones adecuadas del medio, se pueden también some-
ter al procedimiento concentrados brutos de inmunoglobu-
linas, obtenidos de otro modo. El suero es también uti-
10 lizable como material de partida si, por ejemplo por adi-
ción de sal, se ha producido una isotonía correspondien-
te a la de un plasma. Debido a otra ventaja del proce-
dimiento según la invención, de que los productos fina-
les son negativos en la electroforesis de supermigración
15 para el reconocimiento de antígenos Australia, se puede
utilizar también en el procedimiento un plasma de partida
que contiene antígeno Australia.

Los productos finales del procedimiento
son muy bien adecuados para la administración clínica a se
20 res humanos, como agentes profilácticos de inmunización
y agentes terapéuticos de inmunización específicos. En
especial los preparados son usados, por ejemplo, para la
sustitución profiláctica en casos de carencia o disminu-
ción de I_M, o de I_gM + I_gG, o de I_gA, incluido el sín-
25 drome transitorio de carencia de anticuerpos en los niños

5 prematuros y en los niños lactantes de poca edad, en el caso de infecciones congestionadas en especial por agentes patógenos gramnegativos, la IgA en especial en algunas enfermedades pulmonares en las que se había observado una reducción del nivel de IgA, además para la terapia de enfermedades bacterianas graves que son provocadas por agentes patógenos gramnegativos tales como E. coli, Pseudomonas aeruginosa, H. influenzae y pertussis, B. proteus, Klebsiellas, Salmonellas y Shiegellas.

10 Para la profilaxia se recomienda con frecuencia la administración de 4-8 mg de las inmunoglobulinas IgA e IgM y > 32 mg de IgG por kg de peso corporal. En este caso se deberá repetir la administración con la misma dosis al cabo de 10-14 días, y después repetirla a intervalos de 4 semanas cada vez.

15 Para la terapia se administran ventajosamente, según el cuadro clínico, 10-20 mg de las inmunoglobulinas IgA e IgM y > 80 mg de IgG por kg de peso corporal. Se aconseja la repetición de la inyección con un intervalo de una semana cada vez hasta el éxito clínicamente apreciable, es decir, hasta la superación de la infección.

20 Las inmunoglobulinas obtenidas según la invención se administran de preferencia por vía intramuscular. Son bien toleradas incluso después de una adminis

25

tracción repetida.

El procedimiento reivindicado proporciona las inmunoglobulinas exentas del antígeno Australia, que podría ser reconocido en la electroforesis de supermigración. Puesto que un preparado exento del antígeno Australia puede ser también considerado como exento del virus de la hepatitis, en ello hay que ver un avance fundamental en la terapia por inmunoglobulinas.

Otro campo de utilización del producto según la invención está en el sector del diagnóstico clínico. Las sustancias son adecuadas en especial como preparados patrón para la determinación de las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM. Las inmunoglobulinas son utilizables para la preparación de antisueros dirigidos contra ellas, que pueden ser utilizados para el reconocimiento y para la determinación de las inmunoglobulinas en el diagnóstico.

La invención se explica por el ejemplo mencionado a continuación.

20

Ejemplo

20 litros de plasma mixto humano, de pH 7,6, se mezclan a -2°C con 1,82 litros de etanol (al 96%) y se centrifugan a -2°C para la separación del fibrinógeno precipitado. La porción sobrenadante se mezcla de nuevo con 5,15 litros

25

de etanol (al 96%) a -5°C y el precipitado se separa a -5°C en una centrífuga.

5 La pasta obtenida como residuo se disuelve en 18 litros de una solución acuosa al 1 por ciento de glicina y, después de ajustar la conductividad a $1 \times 10^3 \mu\text{S}$ con solución saturada de cloruro sódico, se ajusta a pH 5,1 por adición de 86 ml de HCl 1N.

El precipitado que aparece después de ello se separa por centrifugación.

10 La porción sobrenadante se lleva a una conductividad de $6,0 \times 10^3 \mu\text{S}$ con solución saturada de cloruro de sodio y se mezcla con 131 g de Pharmasorb (Chemie-Mineralien-Bremen). El valor del pH se regula después a pH 5,5 con HCl 1N y se separa el adsorbente por filtra-
15 ción.

Al producto filtrado, que asciende a 22 litros, se añaden, con agitación, 1640 ml de solución 1 molar de acetato de calcio y 1640 ml de solución 1/3 molar de hidrógeno fosfato disódico. El valor del pH se ajusta con
20 NaOH2N a pH 7,9 y después el conjunto se deja reposar durante 12 horas. Después se obtiene el adsorbente por centrifugación. La porción sobrenadante contiene IgG e IgA. Su tratamiento se describe más abajo.

25 El precipitado de fosfato de calcio obtenido se suspende en 3,7 litros de una solución de cloruro de sodio al

0,85 por ciento y se mezcla con la sal disódica de ácido etilen-diamino-tetraacético hasta una concentración final de 4,5 %. Con lejía de sosa 2N se mantiene el valor del pH en 5,0. La temperatura es de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Después
5 de 24 horas, el residuo de fosfato de calcio que queda, se separa por centrifugación y se desecha.
La porción sobrenadante se enfría a -5°C y se ajusta el valor del pH a 7,0 por adición de NaOH 2N y sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético al 2%. La solución
10 transparente así obtenida (4,15 litros) se mezcla con 1460 ml de etanol (al 96%), lo que corresponde a un 25 %, y se deja reposar durante 2 horas.
Acto seguido se obtiene el precipitado por centrifuga-
ción y se disuelve en una solución acuosa de cloruro de
15 sodio al 0,3 % y de glicina al 1 %, tomándose una cantidad tal de solución acuosa que el contenido de proteínas sea de 1%. La conductividad se lleva, por dilución, a $1,5 \times 10^4 \mu\text{S}$ y el valor del pH a 4,8. A 5°C se añaden después 146 ml, correspondientes a un 10 % (volumen: volu-
20 men) de una suspensión de un gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (contenido : 2 % calculado como Al_2O_3). Al cabo de 1 hora se separa el $\text{Al}(\text{OH})_3$ por centrifugación de la solución de IGM.
Antes de su utilización, la solución obtenida puede ser dializada por procedimientos habituales y/o puede ser con
25 centrada a un contenido de proteínas de 10 %, por ejemplo,

por medio de un ultrafiltro. Para la administración por vía parenteral, el concentrado del IglI se ajusta a un contenido de 20 % de IgM y 80 % de IgG y, después de completar el contenido de sales a 0,3 % de NaCl (peso : volumen) y 2,25 % de glicina (peso : volumen), se filtra asépticamente (hasta quedar libre de bacterias).

Una variante especialmente ventajosa del procedimiento para la obtención de IgM pura se puede intercalar en la última etapa de la obtención de esta proteína, llevando a cabo, en lugar de la adsorción de las impurezas por medio de $Al(OH)_3$, una nueva precipitación con etanol. Para ello, en lugar de la adición del $Al(OH)_3$ a la solución ajustada al 1% de proteínas, a pH 7,0 y con una conductividad algo superior a $1 \times 10^4 \mu S$, se añade etanol hasta una concentración de 15 %, a una temperatura de $-5^\circ C$. El precipitado que se produce de este modo contiene IgM con alta pureza y puede ser tratado posteriormente como se ha descrito antes.

Las inmunoglobulinas IgG e IgA son precipitadas de la porción sobrenadante de la adsorción con fosfato de calcio, cuyo volumen es de 25 litros, después de ajuste del valor del pH a 6,8 con HCl 1N, por adición de 9000 ml de etanol (al 96%) a $-5^\circ C$. La pasta obtenida por centrifugación se libera del agente precipitante por desecación por congelación. Cuando esto es deseable o necesario,

las inmunoglobulinas IgA e IgG que están presentes conjuntamente aquí, pueden ser utilizadas después de disolución en disolventes adecuados y de una filtración aséptica, sin más tratamientos, como agente terapéutico o profiláctico.

5

Sin embargo, la IgA y la IgG pueden ser también separadas, ventajosamente por adsorción y desorción específica de la IgA desde la IgG que permanece en solución. Para ello, 360 g de la pasta obtenida por centrifugación, aún humedecida con alcohol, se disuelven con 14 litros de una solución de cloruro de sodio al 0,3 %, a + 5°C. El contenido de proteínas es de 1%, el valor del pH se ajusta a pH 5 por adición de 30 ml de HCl 1N y la conductividad se ajusta a $1,5 \times 10^4$ μ S por adición de 345 ml de una solución saturada de cloruro de sodio. A los 14,4 litros de solución así obtenida, que contiene IgA y IgG, se añaden con agitación, a 5°C, 720 ml de un gel de $Al(OH)_3$ al 2% y la suspensión se agita durante 1 hora. Después se separa el adsorbente $Al(OH)_3$ por centrifugación a 5°C.

10

15

Para la desorción de la fracción enriquecida con IgA desde el adsorbente $Al(OH)_3$, el precipitado de $Al(OH)_3$ se agita dos veces a temperatura ambiente, durante una hora cada vez, con 1,8 litros de una solución 1/3 M de fosfato de sodio secundario, y a continuación se centrifuga para la obtención de las porciones sobrenadantes. Las

20

25

porciones sobrenadantes reunidas (3600 ml) se mezclan a -5°C con 1640 ml de etanol. Con ello se obtiene en el precipitado la fracción enriquecida con IgA. Después de separación del precipitado y de su redisolución en agua destilada, se desaliniza la proteína por métodos conocidos y se concentra, por ejemplo, con ayuda de un ultrafiltro. En lugar de etanol se puede utilizar para la precipitación también, por ejemplo, una solución saturada de sulfato de amonio, que en el caso de las proporciones en volumen antes mencionadas, es capaz de precipitar óptimamente la fracción proteínica que contiene la IgA después de adición de 1940 ml. En ambos casos la proporción de IgA es de aproximadamente 43%, y la de IgG es de aproximadamente 57% de la cantidad presente de proteína.

Para la obtención de la IgG a partir de la porción sobrenadante de la adsorción con $Al(OH)_3$, de la que se habían obtenido 14,6 litros en la centrifugación, se lleva a cabo ventajosamente una precipitación con etanol. Para ello, la solución de IgG se mezcla con agitación, con lejía de sosa 2N hasta un valor del pH de 6,8 y a continuación se enfría a 0°C. Durante un nuevo enfriamiento de la solución a -5°C se añaden con agitación 5200 ml de etanol al 96%. El precipitado que se forma se separa por centrifugación y se liofiliza. El producto obtenido es

IgG ampliamente pura.

5 Análogamente se obtienen buenos resultados si la IgA y la IgG se separan una de otra por electroforesis de zonas y precipitación con $ZnSO_4$, correspondiendo a Progr. Immunobiol. Standard Vol. 4 páginas 86-91 (Karger, Basilea/Munich/Nueva York 1970) y se emplean por separado correspondiendo a los requisitos específicos de la terapia.

10 La presente solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, con fecha 30 de Enero de 1.974, bajo el número P 24 04 265.7, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

20

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

25

1ª.- Procedimiento para la obtención o

el enriquecimiento de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM (IgG, IgA, IgM, inmunoglobulinas de las clases G, A y M respectivamente), a partir de suero o de plasma, caracterizado porque a) a partir de suero o de plasma desfi-
5 brinado se precipita, con un alcohol primario de cadena corta, una fracción bruta de inmunoglobulinas, b) el precipitado de la etapa (a) se lleva a un estado de solución acuosa, y de ella se precipitan las euglobulinas por ajuste de una conductividad baja y de un valor
10 de pH débilmente ácido, c) de la porción sobrenadante de la etapa (b) se separan los fermentos proteolíticos por adsorción en un adsorbente mineral, d) en la porción sobrenadante de la etapa (c) se adsorbe la parte predominante de la IgM, junto a otras proteínas, en un fos-
15 fato difícilmente soluble, y se separa el adsorbato, e) del adsorbato de la etapa (d) se desorbe una fracción, que contiene IgM, y la IgM se enriquece por precipitación con un alcohol primario de cadena corta, f) el precipitado de la etapa (e) se lleva al estado de solución
20 acuosa, se mezcla con hidróxido de aluminio para la eliminación de impurezas, y se separa de nuevo aquél, g) de la porción sobrenadante de la etapa (d), liberada de IgM por adsorción, se precipitan la IgG y la IgA con un alcohol primario de cadena corta, y h) en el caso de que
25 se desee, para la separación de la IgG y de la IgA, la

IgA se adsorbe selectivamente en hidróxido de aluminio.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la separación de la fracción bruta de inmunoglobulinas por medio de etanol en la etapa (a) se lleva a cabo con una concentración entre 18 y 35 %, en un intervalo de pH de 5,6 a 8,5, a una temperatura de 0 a -10°C.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque en la etapa (b), las euglobulinas de la solución acuosa de la fracción de inmunoglobulinas son separadas por precipitación con una conductividad de $5,0 \times 10^2$ hasta $8,0 \times 10^3$ μ S (S=Siemen), por acidificación a pH 4,5 a 6, en el intervalo de temperatura desde 0 hasta +20°C.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque a la porción sobrenadante, libre de euglobulinas, de la etapa (b) se le añade un adsorbente mineral, en una cantidad de 0,3 a 1 % (peso:volumen), con una conductividad de $5,0 \times 10^2$ hasta $1,0 \times 10^4$ μ S, y a un valor de pH de 4,5 hasta 6,5.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque en la etapa (c) se utiliza un fosfato de calcio preparado "in situ".

6ª.- Procedimiento según la reivindicación 5ª, caracterizado porque, para la preparación del

fosfato de calcio, se añaden, a la solución de proteínas, que contiene la IGM, una sal de calcio soluble en agua y un fosfato soluble en agua, estando presente la sal de calcio en un exceso molar de aproximadamente tres veces.

5

7ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª, caracterizado porque se utilizan fosfato de sodio secundario y acetato de calcio.

10

8ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª, caracterizado porque la concentración de la sal de calcio es de 0,025 a 0,1 molar, ventajosamente 0,07 molar, y porque el valor del pH se ajusta a de 5,8 hasta 8,5.

15

9ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el adsorbato de la etapa (d), después de separación del fosfato de calcio, se eluye por un tratamiento con 5 a 10 veces su volumen de una solución acuosa de cloruro de sodio, con pH ajustado de 4,0 hasta 8,0, cuya concentración es de 0,8 a 4 %, o de una solución de aminoácido, cuya concentración es de 1 a 8 %, o de una solución acuosa de un agente formador de complejos con calcio, en una concentración de 2 a 7 %, o de una combinación adecuada de cloruro de sodio, aminoácido y agente formador de complejos.

20

25

10ª.- Procedimiento según la reivindicación

ción 1ª, caracterizado porque, a partir del eluato que contiene la IgM, se precipita la IgM por adición de un alcohol inferior hasta una concentración de aproximadamente 20 a 25 %, después del ajuste del valor del pH a pH 6,5 hasta 7,5.

5

11ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el precipitado de la etapa (e) se separa por centrifugación o por filtración, se disuelve de nuevo en una solución acuosa de cloruro de sodio, se ajusta el valor del pH desde 4,5 hasta 5,5, se ajusta la conductividad por adición de una sal a un valor algo superior a $1 \times 10^4 \mu\text{S}$, y las impurezas de la fracción enriquecida con IgM se separan por adición de 0,1 a 0,3 % de un gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (calculado como Al_2O_3).

10

12ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque, de la porción sobrenadante de la etapa (d), la IgG y la IgA se separan por precipitación con un alcohol inferior, con una concentración de 20 a 40 %, a pH 6,5 a 8,0, a 0 hasta -10°C .

15

13ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el precipitado de la etapa (g), que contiene IgG y IgA, se disuelve hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 1 %, y porque a esta solución, con un pH de 4,5 a 5,5 y una conductividad algo mayor que $1 \times 10^4 \mu\text{S}$, se le añaden 0,05 a

20

25

0,2 % de un gel de $Al(OH)_3$ (calculado como Al_2O_3), y porque la IgA se desorbe después de la separación del adsorbente con una solución de fosfato de sodio secundario aproximadamente 1/3 molar.

5

14ª.- Procedimiento según la reivindicación 9ª, caracterizado porque la elución de la IgM desde fosfato de calcio se lleva a cabo con una solución al 4,5 por ciento de etilen-diamino-tetraacetato disódico, a pH 5,0.

10

15ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como adsorbente mineral en la etapa (b) se utiliza coalín o atapulgita.

16ª.- Procedimiento para la obtención o el enriquecimiento de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM a partir de suero o de plasma.

15

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 5 AGO. 1975
P.A.

Oscar de Elzaburu
Por Poder.

