

7 10 25

**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, 69002 Lyon, Francia,  
relativa a:

**"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN PRODUCTO  
PROTEICO"**

\*\*\*\*\*

**Inventores:** Marie-France Makula y Robert Plan  
**Prioridad:** Solicitud de patente en Francia nº  
74.13019 de fecha 12 abril 1974.

**POOR  
QUALITY**

ABIK 23/00

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un nuevo producto proteico, preparado a partir de sangre humana contenida en la placenta.

5. Este producto es rico en gammaglobulinas utilizables directamente por vía venosa o en asociación con gammaglobulinas standard a las cuales confiere la tolerancia clínica por vía intravenosa. Se puede obtener así una gammaglobulina intravenosa, a partir de placentas, en condiciones económicas ventajosas, sin recurrir a la sangría de seres humanos.

10.

Se sabe que las gammaglobulinas tienen una actividad anticuerpo que les hace utilizables en terapéutica, por ejemplo en el tratamiento o la prevención de las infecciones de origen microbiano o viral, en particular en el caso de los enfermos que sufren de carencias inmunitarias. - -

15.

Las gammaglobulinas se preparan a partir de suero o de sangre extraída de placentas. El procedimiento más a menudo empleado es un procedimiento de fraccionamiento por alcohol. - - - - -

El procedimiento de preparación de gammaglobulinas a partir de placentas ha sido descrito por H. L. TAYLOR, J. AM. CHEM. SOC., 78, 1356 (1956). - - - - -

20.

- Este procedimiento consiste en tratar el filtrado de una suspensión salina de placenta machacada de manera que se obtenga una concentración de etanol igual al 25% en volumen. Se recoge el precipitado I obtenido y se trata con etanol al 8% a pH 4,8. Se elimina el precipitado y se recoge el sobrenadante II. Por adición de alcohol a este sobrenadante, hasta obtención de una concentración de 25% en volumen, se obtiene la precipitación de una fracción III rica en gammaglobulinas. El precipitado III es tratado con etanol al 17% a pH 5,1. Se elimina el precipitado III-1 y se recoge el sobrenadante III-1. Por adición de etanol al sobrenadante, hasta obtención de una concentración del 25% en volumen, se obtiene un precipitado III-2 de gammaglobulinas análogas a las obtenidas por fraccionamiento del plasma sanguíneo. - - - - -
- 5.
  - 10.
  - 15.

Se sabe que las preparaciones de gammaglobulinas obtenidas por fraccionamiento con etanol (llamadas a continuación gammaglobulinas standard) son bien toleradas cuando se administran por vía intramuscular. Por el contrario se observan reacciones a veces muy graves cuando se utiliza la vía intravenosa. - - - - -

- 20.

Esta mala tolerancia ha sido atribuida a una actividad anticomplementaria debido a la presencia de agregados que pueden fijar el complemento como lo hace el complejo antígeno-anticuerpo. - - - - -

- 25.

Esta fijación del complemento corresponde a una ag

tivación de varias enzimas cuyos productos son responsables de las reacciones de intolerancia registradas después de inyección intravenosa de gammaglobulinas standard. - - - - -

5. Se conocen diferentes procedimientos que permiten obtener gammaglobulinas inyectables por vía intravenosa. Estos procedimientos consisten en someter la gammaglobulina standard o bien a una incubación a pH 4, o bien a una digestión enzimática con pepsina, papaína o plasmina. - - - - -

10. En el procedimiento TAYLOR, recordado anteriormente, el precipitado III-1 queda eliminado. - - - - -

15. Se ha descubierto ahora que sometiendo el precipitado III-1 a un tratamiento apropiado, es posible recuperar una fracción de gammaglobulinas ricas en plasmina que se perdía en el procedimiento TAYLOR y obtener así un producto proteico que puede ser utilizado tal cual, o bien para suprimir o reducir el poder anticomplementario de la gammaglobulina standard enriqueciendo, al mismo tiempo, en gammaglobulinas la preparación standard así tratada. - - - - -

20. La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de un producto proteico en la forma siguiente: El producto de partida es el precipitado III-1 obtenido con el procedimiento clásico de fraccionamiento con etanol de sangre placentaria que ha sido recordado anteriormente; se diluye con agua el precipitado III-1, se elimina el alcohol residual por diálisis; se adiciona a la solución  
25.

obtenida una solución acuosa de lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina (L.E.D.A.); a pH  $7,7 \pm 0,5$  preferentemente entre 7,5 y 8,0 se elimina el precipitado formado; se adiciona al filtrado una solución acuosa de sulfato de amonio a una concentración correspondiente aproximadamente a la semisaturación y se aísla el precipitado formado que es el producto proteico de la invención. - - - - -

5.

Este producto proteico contiene una enzima proteolítica (plasmina) cuyo contenido está definido con la ayuda de una "unidad caseinolítica". - - - - -

10.

La unidad caseinolítica está definida como la cantidad de plasmina que produce un aumento de 450  $\mu$ g de tirosina soluble en el ácido tricloroacético sobre la caseína al 3% durante 1 hora a 37°C. Ver "The preparation of human fibrinolysin", SCOURIS y Col, Vox Sanguinis (1960), 5, (4), páginas 357-376. - - - - -

15.

Generalmente el producto proteico obtenido según la invención contiene de 10 a 100 unidades caseinolíticas por gramo de proteínas, pero este contenido puede ser inferior a 10 unidades. - - - - -

20.

Según un modo de realización preferido, el tratamiento con lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina (L.E.D.A.) se efectúa a pH alcalino. Para ello se adiciona a la solución proteínica, antes de la adición del L.E.D.A., una base. Esta base es por ejemplo un hidróxido de metal alcalino tal

25.

- como la soya. El L.E.D.A. es adicionado en cantidad suficiente para obtener una concentración de L.E.D.A. tal que el peso de L.E.D.A. represente aproximadamente  $1/20$  a  $1/4$  del peso de proteínas presentes en la solución. El contenido en proteínas de la solución a tratar está generalmente comprendido entre 5 y 30 g/litro y, preferentemente, es del orden de 20 g/litro. Tomando como ejemplo el contenido de 20 g/litro en proteínas, conviene por tanto adicionar el L.E.D.A. en cantidad suficiente para obtener una concentración final de L.E.D.A. comprendida entre 0,1 y 0,5% aproximadamente. -
- 5.
- 10.

- El precipitado obtenido después de la adición del L.E.D.A. es eliminado por centrifugación. Se adiciona entonces al filtrado una solución acuosa semisaturada de sulfato de amonio, es decir una solución que contiene aproximadamente 300 g de sulfato de amonio por litro. Se aísla por filtración el precipitado del producto proteico formado. - - -
- 15.

Este producto proteico puede ser purificado, si se desea, por puesta en solución acuosa y diálisis. - - - - -

- Según un modo de realización preferido, se efectúa, antes de la etapa de tratamiento con el L.E.D.A., una etapa preliminar que consiste en eliminar la fracción insoluble a pH  $4,5 \pm 0,2$ , particularmente a pH 4,8 - 5,0. Para ello se adiciona un ácido, tal como el ácido clorhídrico, a la solución del precipitado III-1. Se elimina a continuación, por ejemplo por centrifugación, el precipitado formado. Esta etapa preliminar, no obligatoria, facilita la operación
- 20.
- 25.

siguiente de tratamiento con el L.E.D.A. Tiene por efecto eliminar unas lipoproteínas presentes en la solución. - - -

5. Todas las etapas del procedimiento definido anteriormente pueden ser efectuadas a temperatura comprendida entre 0 y 25°C aproximadamente. - - - - -

10. La invención prevé también la aplicación de dicho producto proteico a la obtención de gammaglobulinas utilizables por vía intravenosa, o bien directamente, o bien tratando una gammaglobulina standard con la ayuda de este producto proteico. - - - - -

15. Esta aplicación está principalmente caracterizada porque se somete una solución acuosa de dicho producto proteico, eventualmente mezclada con una solución acuosa de gammaglobulinas standard, a una incubación hasta desaparición del poder anticomplementario. Por convención se considera que el poder anticomplementario ha desaparecido cuando la solución de 50 mg/ml no neutraliza (no fija) 2 unidades de complemento a 50% (2 unidades C' 50%); en otros términos, se considera que el poder anticomplementario ha desaparecido cuando es precisa una concentración superior a 50 mg/ml para fijar 2 unidades de complemento al 50% (Public Health Monograph nº 74, 1965, U.S.A. : Standardised Diagnostic Complement fixation method and adaptation to microtest). - -

25. Según un modo de ejecución preferido esta aplicación presenta las características indicadas a continuación.

La solución sometida a incubación puede contener, por ejemplo, de 50 a 160 g/litro de proteínas. El título en unidades caseinolíticas de la solución sometida a incubación está comprendido entre aproximadamente 1,25 y 10 unidades caseinolíticas por gramo de proteínas, y particularmente entre 4 y 6 unidades caseinolíticas por gramo de proteínas. - - - - -

La incubación se efectúa a pH comprendido entre 4 y 7 aproximadamente. La temperatura de incubación está comprendida entre 10 y 45°C aproximadamente, preferentemente la temperatura de incubación es de 37°C. El tiempo de reacción de incubación depende a la vez del pH, de la temperatura, del título en unidades caseinolíticas de la mezcla de partida y del título máximo de poder anticomplementario final elegido. - - - - -

La duración de incubación disminuye cuando el pH disminuye y cuando la temperatura aumenta. - - - - -

Cuando se efectúa la incubación a 37°C y a pH 7, son precisos generalmente de 14 a 28 días para que el título en poder anticomplementario sea satisfactorio. - - - - -

Cuando se opera a 37°C a pH 4, son suficientes 18 horas de incubación, o para más seguridad de 24 a 48 horas.

Es deseable someter, después de la incubación, la solución de gammaglobulinas a la acción adsorbente de la ben

- tonita para eliminar la enzima proteolítica residual. Se puede por ejemplo adicionar una suspensión de bentonita al 4%, esterilizada en el autoclave, de manera que se introduzcan aproximadamente 5 gramos de bentonita por 100 gramos de proteínas contenidas en la solución. Se ajusta el pH entre 4 y 8, por ejemplo a 5,5 aproximadamente y se agita durante algunas horas, a temperatura comprendida entre 20 y 37°C aproximadamente, por ejemplo 2 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C). Se elimina finalmente la bentonita por ejemplo por centrifugación. - - - - -
- 5.
- 10.

Sin embargo, cuando el título de las unidades caseinolíticas es bajo (por ejemplo inferior a 2 unidades caseinolíticas por gramo de proteínas) el tratamiento con la bentonita puede omitirse. - - - - -

15. Cuando la solución obtenida después de incubación es pirógena o coloreada, conviene someterla por ejemplo a la acción adsorbente de un gel de alúmina (gel obtenido según el método de Willstätter en medio acuoso). Para ello se adiciona una cantidad de gel de alúmina comprendida entre aproximadamente 0,25 a 1 veces el peso de proteínas contenidas en la solución. Este tratamiento se efectúa a pH 5,5 ± 0,5, aproximadamente a temperatura comprendida entre 20 y 45°C aproximadamente. Se agita durante algunas horas, por ejemplo 3 horas a 45°C. La alúmina es seguidamente eliminada por centrifugación. - - - - -
- 20.
- 25.

La gammaglobulina así obtenida se distingue de la

gammaglobulina standard particularmente por unas características de ultracentrifugación, de gel filtración, y también por la ausencia de poder anticomplementario (estando definida la ausencia de poder anticomplementario por convención con la ayuda de un umbral máximo indicado a continuación).  
5. Ensayos clínicos han mostrado que la gammaglobulina obtenida según la invención puede ser administrada por vía intravenosa incluso a sujetos que no soporten la gammaglobulina standard por vía venosa. - - - - -

10. Para conservar la gammaglobulina obtenida después de incubación y eventualmente después de tratamiento con la bentonita o con la alúmina, se la somete a una liofilización. Se obtiene así una preparación de gammaglobulinas que puede ser utilizada por vía intravenosa después de redisolución acuosa. - - - - -  
15.

Se ha descubierto, y ello constituye también objeto de la invención, que se obtiene después de liofilización un polvo de una solubilidad y de una estabilidad mejoradas cuando la liofilización se realiza en presencia de glicocola, a razón de 1 g de glicocola por 2 a 3 g de proteínas, preferentemente 1 g de glicocola por 2,5 g de proteínas aproximadamente. Los ejemplos siguientes ilustran la invención. - - -  
20.

EJEMPLO 1

Se disuelve el precipitado III-1, obtenido según el método descrito por H. L. TAYLOR y Coll, en una vez y media  
25.

su peso de solución acuosa de cloruro de sodio con 3 gramos por litro, enfriada a 0°C. Se somete la solución a diálisis con agua corriente a +4°C durante 3 a 4 días, después se diluye el líquido dializado con agua (10 veces el peso del precipitado de partida). Se ajusta, si es necesario, el pH a 4,8 adicionando una solución normal de ácido clorhídrico. Se somete el líquido diluido a una centrifugación y se elimina el precipitado formado. - - - - -

Se ajusta el pH del líquido sobrenadante a 7,7 por adición de una solución normal de sosa, después se adiciona cloruro de sodio a razón de 2 g por 1000. Se adiciona el L.E.D.A. (en forma de una solución al 1%). Para obtener una buena precipitación, es decir un sedimento de por lo menos 50% y un sobrenadante perfectamente claro, es preciso generalmente adicionar el L.E.D.A. de manera que se obtenga una concentración de 1 a 5 gramos por 1000. La cantidad óptima de L.E.D.A. puede ser fácilmente determinada por unas tomas de ensayo a las cuales se adicionan cantidades progresivamente crecientes de L.E.D.A. Se deja sedimentar durante por lo menos dos horas, se elimina por centrifugación el precipitado, se adiciona al sobrenadante cloruro de sodio a fin de cristalizar el L.E.D.A. en exceso. Se elimina por filtración el precipitado formado. - - - - -

Se adiciona al filtrado sulfato de amonio a razón de 300 gramos por litro de filtrado. Se agita para disolver completamente el sulfato de amonio, y se verifica el pH que debe estar entre 6 y 7. Se recoge por filtración el precipi-

tado formado. Se dializa. - - - - -

Se adiciona glicocola para obtener una concentración de 1% y el pH se ajusta a 7,0. Se filtra estérilmente.

5. Se obtiene así una solución que será designada a continuación por A. - - - - -

Se titula el poder anticomplementario de la solución A. Se incuba si es necesario a 37°C hasta que el poder anticomplementario sea satisfactorio, es decir superior a 50 mg/ml fijando 2 unidades C' al 50%. - - - - -

10. Cuando se alcanza este resultado, se para la incubación. Se dosifican las proteínas y se determina el título en unidades caseinolíticas. Si éste es superior a 0,2 unidades por mililitro para una solución con 100 gramos de proteínas por litro, se efectúa un tratamiento con bentonita.

15. Para ello se adiciona una solución al 4% de bentonita tratada en autoclave en cantidad suficiente para tener 5 gramos de bentonita por 100 gramos de proteínas. Se ajusta el pH a 5,5 por adición de una solución normal de ácido clorhídrico, y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Se elimi-

20. na la bentonita por centrifugación. Si el título en unidades caseinolíticas es aún superior al umbral indicado anteriormente, conviene empezar de nuevo el tratamiento con la bentonita. - - - - -

Se realiza un tratamiento con gel de alúmina. En

función de los pirógenos y del color, se adiciona un peso de gel de alúmina comprendido entre 1 vez y 0,25 veces el peso de las proteínas presentes. En el ejemplo citado, se han puesto 0,5 veces el peso de proteínas presentes. Se ajusta el pH a 5,5 se agita durante 3 horas a 45°C. Se elimina el gel de alúmina por centrifugación. - - - - -

5. Se realiza la dosificación de las proteínas, se ajusta el pH a 7 por adición de una solución normal de sosa, se adiciona agua destilada para ajustar el título de las proteínas a 52 gramos por litro. Se adiciona cloruro de sodio para obtener una concentración de 1 gramo por litro y glicocola para obtener una concentración de 20 gramos por litro. Se filtra estérilmente. - - - - -

10. La solución obtenida es sometida a liofilización. Se obtiene así una preparación de gammaglobulinas que puede ser utilizada por vía intravenosa después de redisolución acuosa estéril. - - - - -

EJEMPLO 2

20. Se adiciona a la solución A, tal como ha sido obtenida en el ejemplo 1, antes de la incubación a una solución de gammaglobulinas standard de manera que se ajuste el título a 5 unidades caseinolíticas por gramo de proteínas. - - -

Si por ejemplo se desean tratar 10 litros de gammaglobulinas standard que contienen 154 gramos de proteínas por

litro, es preciso adicionar X litros de una solución A tal como la obtenida en el ejemplo 1, que contiene 125 gramos de proteínas por litro y que titula 2000 unidades caseinolíticas por litro. - - - - -

5. X es fácilmente determinado de la forma siguiente:

$$\frac{X \times 2000 \text{ cu/l}}{125X + 154 \times 10} = \frac{5}{1}$$

es decir  $X = \frac{7700}{1375}$ , o sea aproximadamente 5,6 litros. - - -

Después de verificación de la esterilidad la mezcla es incubada a 37°C y a pH 7. Se controla regularmente sobre una toma de ensayo, por ejemplo cada 8 días, el poder anticomplementario hasta obtención de su desaparición. Son precisos en general 14 a 28 días. Se considera que el poder anticomplementario ha desaparecido cuando es superior a 50 mg/ml que fijan 2 unidades C' 50%. Se para la incubación y se trata con la bentonita y el gel de alúmina en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. - - - - -

10.

15.

EJEMPLO 3

20.

Se opera de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 2, pero se adiciona la solución A, tal como ha sido obtenida en el ejemplo 1, en condiciones de pH y de concentración enzimática diferentes. - - - - -

La concentración enzimática es ajustada a 1,25 uni

dades caseinolíticas por gramo de proteínas. La incubación se efectúa a pH 4 durante 18 horas a la temperatura de 37°C. Se opera a continuación como en el ejemplo 1, pero se omite el tratamiento con la bentonita. - - - - -

5. Se obtiene una preparación de gammaglobulinas que puede ser utilizada por vía intravenosa después de disolución acuosa. - - - - -

N O T A

10. Se declaran 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

15. 1.- Procedimiento de preparación de un producto proteico, caracterizado porque se diluye en agua el precipitado III-1, se trata la solución con una solución de lactato de 2-stoxi 6,9-diamino acridina, se elimina el precipitado formado, se adiciona al filtrado una solución acuosa de sulfato de amonio semisaturada, y se aísla el precipitado formado. - - - - -

20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se efectúa el tratamiento con la solución de lactato de 2-stoxi 6,9-diamino acridina a pH alcalino, del orden de  $7,7 \pm 0,5$ . - - - - -

3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindi

caciones 1 y 2, caracterizado porque se adiciona el lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina de manera que se obtenga una concentración comprendida entre 0,1 y 0,5% aproximadamente.

5. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el precipitado final es aislado por centrifugación. - - - - -

10. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque se somete además el producto proteico obtenido a una diálisis, después de ser puesto en solución acuosa. - - - - -

15. 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se efectúa, antes del tratamiento con el lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina, una etapa preliminar que consiste en eliminar la fracción insoluble a pH  $4,8 \pm 0,2$ . - - - - -

20. 7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se diluye en agua el precipitado III-1 obtenido cuando tiene lugar el procedimiento clásico de fraccionamiento con etanol de extractos placentarios; se elimina la parte insoluble a pH  $4,8 \pm 0,2$  aproximadamente; se trata la solución restante con una solución de lactato de 2-etoxi 6,9-diamino acridina; se elimina el precipitado formado; se adiciona al filtrado una solución acuosa de sulfato de amonio semisaturada; y se aísla el precipitado formado. - - - -

25. 8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindi

5. caciones 1 a 6, caracterizado porque, para la preparación de gammaglobulinas por vía intravenosa, se somete una solución acuosa del producto proteico, eventualmente mezclada a una solución acuosa de gammaglobulinas standard, a una incubación hasta eliminación del poder anticomplementario, es decir hasta que el poder anticomplementario sea inferior a un cierto umbral definido por el hecho de que es preciso un título superior a 50 mg/ml para fijar 2 unidades C' 50%. - -

10. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se efectúa la incubación a pH comprendido entre 4 y 7 aproximadamente. - - - - -

10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque se efectúa la incubación a pH 7. - - - -

15. 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque se efectúa la incubación a temperatura comprendida entre 10 y 45°C aproximadamente. - - - - -

20. 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque se efectúa la incubación a 37°C aproximadamente. - - - - -

25. 13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado porque se somete además la mezcla incubada a la acción adsorbente de la bentonita, a pH comprendido entre 4 y 8, y después se elimina la bentonita. - - - - -

- 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, ca  
racterizado porque se efectúa el tratamiento por la bentoni  
ta a pH 5,5 aproximadamente. - - - - -
5. 15.- Procedimiento según cualquiera de las reivin  
dicaciones 8 a 14, caracterizado porque se somete además la  
mezcla incubada a la acción adsorbente de un gel de alúmina  
y después se elimina el gel de alúmina. - - - - -
10. 16.- Procedimiento según cualquiera de las reivin  
dicaciones 8 a 15, caracterizado porque se somete, además,  
la solución de gammaglobulinas obtenida a una liofilización.
- 17.- Procedimiento según la reivindicación 16, ca  
racterizado porque se efectúa la liofilización en presencia  
de glicocola, a razón de 1 g de glicocola por 2 a 3 g apro  
ximadamente de proteína. - - - - -
15. 18.- Procedimiento según la reivindicación 17, ca  
racterizado porque se utiliza 1 g de glicocola para aproxi  
madamente 2,5 g de proteína. - - - - -
- 19.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN PRODUCTO  
PROTEICO". - - - - -
20. Todo ello conforme se describe y reivindica en la  
presente memoria que consta de dieciocho hojas foliaias y me  
canografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 11 ABR. 1975

P. A. M. CURELL SUÑOL

