

437377

437377

Int. Cl. C02G//A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: INSTITUTO LORENTE, S.A.

RESIDENCIA: Gral. Rodrigo, 6- 4ª planta

MADRID (3)

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE

ALBUMINA A PARTIR DE PLASMA HUMANO.

Prioridad: Patente n.º del

MG.

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a un procedimiento nuevo y ventajoso de fraccionamiento a escala industrial de proteínas séricas, basado principalmente en el poder individual de ciertos polímeros, como polietilenglicol para desplazar partículas coloidales en solución.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La técnica del alcohol a baja temperatura para fraccionamiento de plasma humano fué desarrollada inicialmente en la Escuela de Medicina de Harvard por Cohn y colaboradores en 1940-1942. Desde entonces, el proceso se ha mejorado y refinado considerablemente.

20

El objetivo de esta técnica de fraccionamiento era la producción a gran escala de preparados de proteínas séricas de origen humano y ha demostrado ser mucho más eficaz que otros métodos basados en la precipitación selectiva por "salting out" (desplazamiento salino). Este último proceso es manifiestamente menos selectivo y específico que el sistema de "salting in" (retención salina) debido a que está basado en los fuertes efectos precipitantes de las sales a elevada concentración aplicadas a proteínas en solución. El sistema "salting in" (retención salina), por otro lado, se basa en la capacidad disolvente de las sales a bajas concentraciones cuando se aplican a soluciones similares de proteínas coloidales.

25

30

Edsall ha observado que: "Estas configuraciones -

1 eléctricas son a menudo muy características para las molé-
culas de proteínas individuales, para algunas de las cua-
les se pueden conseguir grandes cambios en la solubilidad
con pequeñas variaciones de la fuerza iónica o constante
5 dieléctrica del disolvente. Lo que es más, tanto los efec-
tos de la sal a baja fuerza iónica como los de los reacti-
vos orgánicos tales como el etanol son muy específicos para
las distintas proteínas individuales. En contraste con esto,
el efecto de retención salina ("salting in") en soluciones
10 de sales muy concentradas es relativamente insensible a las
características químicas específicas de la proteína y depen-
de muchísimo de factores relativamente inespecíficos como
son el tamaño general y la forma de las moléculas. El pro-
ceso de desplazamiento salino ("salting out") incluye un
15 sistema que puede describirse en función de cuatro varia-
bles esencialmente independientes, que son: concentración
de sal, concentración proteica, pH y temperatura".

Igualmente, en la obra LEHRBUCH DER PHYSIOLOGIS-
CHEN CHEMIE de Eldbacher y Leuthardt, Cap. 22, aparece lo
20 siguiente: "Cuando el plasma se mezcla con cantidades cre-
cientes de solución concentrada de sal, precipitan cantida-
des cada vez mayores de proteínas de la solución. De modo
que las proteínas son fraccionadas de acuerdo con su solubi-
lidad, o sea que las proteínas menos solubles en la solu-
25 ción salina concentrada son las primeras en precipitar. Pe-
ro de esta forma, no conseguimos compuestos químicamente
homogéneos. Las zonas de precipitación de las distintas pro-
teínas se superponen entre sí, es decir, una proteína empie-
za a precipitar antes de que otra haya precipitado por com-
30 plete; todavía mas, las solubilidades de los distintos com-

1
puestos están influidas de manera complicada por la presencia del resto. Así, en el fraccionamiento normal de plasma o suero, se obtiene siempre una mezcla de proteínas en lugar de sustancias homogéneas".

5
Por ello, el proceso de desplazamiento salino ha quedado relegado casi exclusivamente a las preparaciones comerciales de fracciones proteicas en las que se usan materias primas tales como sangre placentaria, extracto de placentas, plasma de animales u otros compuestos biológicos proteicos fáciles de obtener.

10
Después de 34 años de experiencia acumulada en la producción de fracciones proteicas utilizando el método Cohn, hay todavía importantes inconvenientes que aparecen a tres niveles distintos:

15
(a) Económico: El rendimiento industrial de los dos productos principales, inmunoglobulina, y albúmina, no pasa del 60% del contenido original en el plasma. Teniendo en cuenta el coste de una planta y su mantenimiento, además de la necesidad de tratar grandes cantidades de materia prima con el fin de lograr un rendimiento aceptable, está claro que hay que buscar un método más económico.

20
(b) Técnico: La falta de uniformidad en el procesado y en los productos farmacéuticos finales a partir de derivados del plasma se debe a diferencias en la solubilidad, estabilidad, filtrabilidad, agregados moleculares y grado de desnaturalización. Estas variables dan lugar a dificultades de fabricación, comunes en todo el mundo, que son debidas en gran parte al efecto agresivo del precipitante sobre la frágil estructura molecular de las proteínas plasmáticas. La Organización Mundial de la Salud, en su se-

25
30

1 rie de Informes Técnico nº 327 sobre el Uso de la Inmunoglobulina Humana (versión inglesa en la parte superior de la pag. 8), dice: "La técnica del etanol frío ha sido la más empleada con diferencia. Sin embargo, es imperfecta ya que se producen alteraciones de las proteínas del plasma y se considera comúnmente como una técnica costosa".

5 Los sistemas clásicos de producción en uso no son capaces de asegurar la cantidad y calidad en la precipitación fraccionada de las proteínas séricas humanas. Es casi imposible aislar cuantitativamente cualquiera de estas proteínas en estado puro. Esto se debe a que no existen condiciones claras aplicables a la precipitación de proteínas individuales en una mezcla. En otras palabras, hay zonas difusas con valores comunes, de modo que en un proceso continuo y antes de que se precipite por completo una proteína individual, otras proteínas de la mezcla empiezan a precipitar. Por esta razón, la precipitación fraccionada solo puede dar bajos rendimientos de proteína pura en una exposición corta al agente precipitante o rendimientos altos de una mezcla proteica durante una exposición prolongada.

15 Los autores, por ello, decidieron que, con el fin de conseguir cantidad y calidad, se deberían evitar los sistemas de precipitación fraccionada que llevan consigo un tratamiento agresivo y que habría que considerar la necesidad urgente de desarrollar nuevas técnicas de fraccionamiento proteico.

COMPENDIO DE LA INVENCION

20 Durante los últimos años, los autores de esta invención, han desarrollado una técnica, adecuada al fraccionamiento a escala industrial. Esta técnica, que tiene gran

1 des ventajas, se basa principalmente en el poder individual
de ciertos polímeros para desplazar partículas coloidales -
en solución. Incluye procedimiento físicos suaves que evi-
tan las precipitaciones fraccionadas mientras que el meca-
5 nismo de "exclusión en el espacio" asegura el desplazamien-
to de moléculas coloidales de proteínas sin perjudicar a -
su estructura molecular intrínseca.

PARTE EXPERIMENTAL

10 Mediante el procedimiento de esta invención -
es posible el aislamiento de albúmina en estado de gran pu-
reza, con altos rendimientos y mayor estabilidad.

15 El material inicial es plasma en tampón citra-
to-fosfato a pH 7,0. La temperatura durante todo el proceso
se mantendrá entre 4º y 8º C y el material utilizado debe
estar esterilizado y libre de pirógenos de acuerdo con las
normas.

El procedimiento seguido es el siguiente:

20 Se utiliza como material de partida plasma hu-
mano exento de antígeno Australia. Al mismo se añade una so-
lución de cloruro cálcico al 10% para coagular el fibrinó-
geno. Se separa el suero del precipitado por decantación y -
se añade al primero sal sódica del ácido etilendiaminote-
traacético (EDTA), ajustado al pH entre 7,5 y 8,6 con cris-
tales de fosfato trisódico. La Figura 1 representa al dia-
25 grama electroforético del plasma de partida conteniendo to-
das las proteínas, mientras que la Figura 2 es el diagrama
electroforético del suero exento de fibrinógeno observándo-
se la desaparición del pico correspondiente a este último.
Al suero mantenido a pH 7,5-8,6 se agrega entonces, de for-
30 ma continua pero no brusca, un volumen igual de una solu-

1 ción estéril de PEG 6000 (polietilenglicol de peso molecular
6000 al 30% en peso/volumen y a pH comprendido entre 7,5 y
8,6 con lo que se forma un precipitado o sedimento (SEG-1G) que
5 contiene la γ -globulina (también llamada inmunoglobulina) y
cantidades menores de α_2 y β -globulinas así como una pequeña
cantidad de albúmina; el líquido que sobrenada (SNF-1A) contie
ne la mayor parte de albúmina y pequeñas cantidades de α_1 , α_2
y β -globulinas. El sedimento se separa del líquido sobrenadante
10 por centrifugación. Las figuras 3 y 4 representan, respectiva
mente, los diagramas electroforéticos del sedimento SED-1G re-
disuelto en tampón a pH 6,9 del líquido sobrenadante, y del
SNF-1A. En este último, el pico de la izquierda es el correspon
diente a la albúmina.

15 El líquido sobrenadante SNF-1A se destina a la obtención
de albúmina por barrido lento del pH y exclusión con PEG 6000.
Se ajusta el pH a 6,2 con ácido fosfórico diluido al 10% apro
ximadamente y se añade alrededor de un 7% de PEG en polvo ba
jando seguidamente el pH hasta 4,5 con fosfórico. Se centrifu
ga obteniéndose un sobrenadante SNF-2A y un sedimento SED-2A.
20 Este último se disuelve en agua destilada estéril y apirógena,
se ajusta el pH a 4,5 con ácido fosfórico al 10% y se añade un
3% (p/v) de PEG en polvo. Se deja en reposo a 4°C durante 48
horas y después se separa el sedimento SED-3A que contiene la
 α_1 -globulina. El líquido que sobrenada, SNF-3A, cuyo diagrama
25 electroforético está representado en la Figura 4, se ajusta a
pH 5,2 con hidróxido sódico 2N. Se añade un 3% de PEG en polvo
y se deja en reposo a 4°C durante 48 horas. Se separa un sedi
mento SED-4A que contiene la α_2 -globulina y parte de β -glo
bulina y un líquido sobrenadante SNF-4A, cuyo diagrama electro
30 forético está representado en la Fig. 5. Se ajusta el SNF-4A a
pH 5,8 con hidróxido sódico 2N y se añade 6% en peso-volumen

1 de PEG en polvo. Se deja en reposo a 4°C durante 18-22 horas
y después se separa el SED-5A del SNF-5A. Este último es una
solución de albúmina pura cuyo diagrama electroforético se en-
cuentra representado en la Fig. 6. Se eleva el pH del SNF-5A
5 a 6,2 con hidróxido sódico 2N y se añade, a 4°C, un 10% en pe-
so/volumen de PEG en polvo. Después se desciende gradualmente
el pH hasta 4,9 con ácido fosfórico al 10% con lo que precipi-
ta toda la albúmina. Este precipitado, SED-6A una vez disuel-
to en agua destilada, estéril, apirógena y fría (4°C), puede
10 someterse a filtración clarificante y liofilización y a pos-
terior eliminación del PEG residual por extracción con cloro-
formo.

El PEG residual (entre 2 y 3%) es perfectamente inocuo,
intravenosa e intramuscularmente. Carece de toxicidad aguda y
15 crónica. Se elimina rápidamente por orina al ser inyectado in-
travenosamente. Este PEG residual estabiliza las proteínas,
mejorando su solubilidad y filtrabilidad. Por lo tanto, no es
interesante su eliminación total.

A continuación damos algunos ejemplos de puesta en
20 práctica del procedimiento de la invención.

EJEMPLO 1

Se añade cristales de fosfato trisódico a un suero
de plasma diluido para ajustar el pH a 8,6 y se agita mientras
se añade un volumen igual de solución al 30% p/v de PEG 6000.
25 El precipitado que se forma contiene toda la γ -globulina
junto con algo de α_2 y β -globulinas y una pequeña cantidad de
albúmina que queda ocluida en el precipitado. El precipitado
se centrifuga y se sigue procesando para obtener immuno-
globulina. El líquido que sobrenada se conserva para pro-
ducir albúmina. Se baja paso a paso el pH durante un
30 periodo de varios días, desde 8,6 a 5,8 aumentando la

1 concentración de PEG paralelamente al descenso de pH, hasta
conseguir una concentración final aproximada del 22%. Se -
forman unos precipitados copiosos que se pueden separar por
filtración sencilla o por simple decantación. El filtrado -
5 final es transparente pero tiene color amarillo.

EJEMPLO 2

1. Coagulación del fibrinógeno

Al plasma exentode antígeno Australia desconge-
do se añade una solución de cloruro cálcico al 10% (10 cc -
10 por litro de plasma). Cuando se considera necesario acele-
rar el proceso de coagulación, se incluye en el lote de 10
a 15 l de plasma fresco o congelado muy reciente. Se espera
a que la gelificación sea total. El plasma se ha de mante-
ner entre 4 y 8º C. El coágulo se tritura (con pequeñas in-
15 terrupciones) hasta partícula fina y flotante. Se descanta
el suero claro a través de una malla inoxidable del nº 70 o
100. La masa de fibrina se lava con agua destilada estéril
apirógena y el líquido de lavado se incorpora al suero. Se
recoge en un reactor estéril el suero y se afora con el lí-
20 quido de lavado de la fibrina hasta 250 litros. El suero se
mantiene entre 4 y 8º C.

II. Exclusión previa

1.-Secuestro de iones metálicos y ajuste de PH

Una vez aforado a 250 litros el suero, se disuel-
25 ven en el mismo 400 g de EDTA sódico. Se ajusta el pH a 8,6
con cristales de fosfato trisódico. Se agita y se mantiene
la temperatura entre 4 y 8º C.

2. Exclusión

Se añade de forma continua, aunque no brusca,-
30 por cada 100 l de suero, 100 l de solución estéril de PEG -

1 6000 al 30% p/v y pH 8,6 (ajustado con fosfato trisódico).
Se agita durante 5 minutos.

3. Centrifugación

5 Se centrifuga el contenido del reactor (500 l),
alimentando las centrífugas por medio de una bomba que ase-
gure un caudal y una presión constantes durante todo el -
proceso. Todas las piezas desmontables de la instalación -
deben estar estériles y despirogenadas a calor seco. La -
temperatura de los cilindros interiores de recogida de las
10 centrífugas se mantiene entre 4 y 8° C. El sedimento cen-
trifugado se recoge en condiciones estériles. Se pasa a un
reactor para su disolución. El sobrenadante (SNF-1A) se re-
coge aparte y de forma estéril, destinándose a la obtención
de albúmina.

15 111.-Proceso de obtención de albúmina. Exclusión total pre
via.

1. Ajuste

El sobrenadante SNF-1A obtenido en la operación
11, fase 3, se recoge en reactor estéril y se enfría a 4-5°
20 C. Dicho sobrenadante ha de presentar una concentración de
proteínas de 1,8% ($\pm 0,2$), siendo la fracción electroforé-
tica correspondiente a la albúmina el 78% (± 2) de las pro-
teínas totales. Se baja el pH hasta 6,2 con ácido fosfóri-
co diluído al 10% aproximadamente. Sin interrumpir la agi-
25 tación, se añade un 7% de PEG en polvo. Se garantiza la -
disolución total del PEG y una exclusión del tipo de flocu-
lación, Es muy importante evitar la formación de coacerva-
dos y pastas no centrifugables. El pH se ajusta a 4,9 con -
ácido fosfórico diluído.

30

2. Centrifugación

1 Se centrifuga según las normas de la operación 111,
fase 3. El sobrenadante SNF-2A no debe dar reacción posi-
tiva de proteínas con el reactivo Esbach. Se recoge aséptica-
mente el SED.2A.

5 IV.- Proceso de exclusión por barrido de pH

1. Ajuste

10 Se redisuelve el SED-2A en agua destilada estéril
y apirógena, hasta completar 250 l de disolución. Se ajusta
el pH a 4,5 con ácido fosfórico al 10%. Se añade un 3% -
(p/v) de PEG en polvo. Se asegura la disolución. Se deja en
reposo a 42 C durante 18-22 horas, pudiendo aumentar hasta
48 horas y después filtrar por placa clarificante.

2. Separación

15 Se extrae la pasta excluída, decantada y filtra-
da a través de la válvula inferior, recogiénola aséptica-
mente en recipiente inoxidable estéril. Se congela la pas-
ta que constituye el SED-3A.

3. Ajuste

20 Se eleva el pH hasta 5,2 con hidróxido sódico 2N.
Sin interrumpir la agitación, se añade un 3% de PEG en polvo.
Se asegura la disolución y se deja en reposo a 42 C durante
48 horas, después de lo cual se filtra.

4. Separación

25 Se extrae la pasta excluída y decantada por la -
válvula inferior, recogiénola asépticamente en un recipien-
te inoxidable estéril. Se congela la pasta que constituye
el SED-4A.

5. Ajuste

30 Se eleva el pH hasta 5,8 con hidróxido sódico -
2N. Sin interrumpir la agitación, se añade un 6% p/v de PEG

1 en polvo. Se asegura la disolución y se deja en reposo a -
42 C durante 18-22 horas y después se filtra.

6. Separación

5 Se extrae la pasta excluída y decantada por la -
válvula inferior, recogiénola asépticamente en un recipien
te inóxidable estéril. Se congela la pasta que constituye -
el SED-5A. El líquido sobrenadante SNF-5A se pasa a un reac-
tor.

V.- Exclusión total final

10 1. Ajuste

Se eleva el pH a 6,2 con NaOH 2N. Sin interrumpir
la agitación y a 42 C, se añade un 10% p/v de PEG en polvo.
Hay que asegurarse que se produce una exclusión del tipo de
15 floculación, evitando la formación de coacervados no centri-
fugables. Se desciende gradualmente el pH hasta 4,9 con áci-
do fosfórico al 10%.

2. Centrifugación

Se centrifuga siguiendo las normas de la operación
III, fase 3. Se recoge asépticamente el SED-6A. El SNF-6A de
20 be dar reacción negativa con el reactivo Esbach.

VI.- Tratamiento del SED-6A.

1. Redisolución

Se redisuelve hasta una concentración del 10% en
proteínas aproximadamente (60-80 l) en agua destilada estéril
25 y apirógena fría (42C). Se ajusta a pH 6,8 con hidróxido só-
dico 2N.

2. Clarificación

Se filtra a presión (1 atmósfera). Aunque la fil-
tración no es esterilizante, toda la instalación deberá es-
30 tar esterilizada. La filtración debe realizarse a una tempe-

1 ratura máxima de 62 C.

VII.- Liofilización

El filtrado anterior se liofiliza inmediatamente. La operación VII-A se programa de manera que enlaza directamente con la VIII-A, evitándose tiempos muertos entre ambas. La liofilización se realiza en bandeja.

VIII.- Tratamiento final

1. Eliminación del PEG residual

El polvo seco liofilizado se suspende en cloroformo Q.P. frío y seco. Se agita la suspensión a 6-72 C durante 10 minutos. Se filtra a vacío lentamente y se escurre bien el cloroformo. Se vuelve a desleir el liofilizado en cloroformo Q.P. frío y seco. Se filtra de nuevo y se elimina al máximo el cloroformo. El liofilizado se recoge en bandejas inoxidables y en capa fina, sin grumos.

2. Secado

Se seca a vacío en estufa estática a 20-252 C, durante 3 horas o hasta desaparición absoluta del Cl₃ CH.

EJEMPLO 3

Recuperación del PEG

Siendo el PEG un producto caro, es interesante, su recuperación para volver a utilizarlo.

Para lograrlo, primero se separa la proteína que queda (prealbúmina) en la solución de polímero, bajando el pH a 4,2 con ácido fosfórico y centrifugado, luego, la mayor parte del PEG se separa por extracción del concentrado de polímero con cloroformo. El PEG y el cloroformo pueden entonces recuperarse por destilación de la solución. El coeficiente de distribución del PEG entre el cloroformo y el agua es el orden de 11:1. Así pues, más del 90% del polímero pue-

1 de recuperarse cuando se extrae el PEG con un volumen de -
cloroformo igual al de la solución del PEG.

Ventajas del nuevo método de fraccionamiento

5 Las ventajas que el método de exclusión con po-
límeros tiene sobre el método del criotanol son las siguien-
tes:

- a) puede realizarse a temperaturas superiores a 0^o C.
- b) no se emplean sustancias químicas que pueda perjudicar -
a los componentes del plasma (el uso de cloroformo es
10 opcional y además se emplea sobre producto seco ~~totalmen-~~
te terminado, sobre el que no ejerce ningún efecto).
- c) el rendimiento de recuperación de las fracciones es ele-
vado, en comparación con el obtenido en el procedimien-
to del criotanol, obteniéndose la pureza aceptada por -
15 todas las farmacopeas.
- d) el polímero (PEG) puede recuperarse casi por completo -
de la solución madre para volver a ser utilizado, por -
extracción con cloroformo.
- e) las α_1 -, α_2 - y β -globulinas se separan de forma que su
20 estructura molecular permanece inalterada, lo que per-
mitirá su futura aplicación clínica una vez que ésta -
sea desarrollada, como está previsto.

25 En resumen, la Patente de Invención que se so-
licita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE ALBUMINA
A PARTIR DE PLASMA HUMANO, que consiste en:

- A). añadir al plasma humano, exento de antígeno
Australia, una solución de cloruro cálcico para coagular -
30 el fibrinógeno; separar el suero del precipitado por decan

1 tación y añadir al primero sal sódica de ácido etilendiami-
notetraacético, ajustando el pH entre 7,5 y 8,6 con crista-
les de fosfato trisódico; agregar después al suero, de forma
5 continua pero no brusca, una solución estéril de PEG 6000 -
al 30% en peso/volumen y a pH comprendido entre 7,5 y 8,6 -
con lo que se forma un sedimento (SED-1 G) y un líquido so-
brenadante (SNF-1A) que se separan por centrifugación:

B) ajustar el pH del SNF-1A a 6,2 con ácido fos-
fórico diluido y añadir alrededor del 7% de PEG en polvo, -
10 bajando el pH a continuación hasta 4,5 centrifugar para ob-
tener un sobrenadante SNF.2A y un sedimento SED-2A; redisol-
ver este último en agua destilada estéril y apirógena, ajus-
tar el pH a 4,5 con ácido fosfórico y añadir un 3% (p/v) de
PEG en polvo; dejar en reposo a 42 C durante 48 horas y des-
15 pués separar el sedimento SE-3A; ajustar a pH 5,2 el líqui-
do sobrenadante de esta última operación, SNF-3A, empleando
hidróxido sódico 2N; añadir un 3% de PEG en polvo y dejar -
en reposo a 42 C durante 48 horas; separar de esta última -
mezcla un sedimento SED-4A y un líquido sobrenadante SNF.4A
20 ajustando el pH del mismo a 5,8 con hidróxido sódico 2N; -
añadir un 6% (p/v) de PEG en polvo y dejar en reposo a 42 C
durante 18-22 horas para después separar el SED-5A del SNF-
5A; elevar el pH de este último a 6,2 con hidróxido sódico -
2N y añadir, a 42 C, un 10% (p/v) de PEG en polvo; después
25 reducir gradualmente el pH hasta 4,9 con ácido fosfórico -
con lo que precipita toda la albúmina, que se puede someter
a filtración clarificante y liofilización y posterior eli-
minación del PEG residual por extracción con cloroformo.

30 2. Se reivindica por último como objeto so-
bre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-
ta: UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE ALBUMINA A PARTIR -

1 DE PLASMA HUMANO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de dieciseis - páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 30 de Abril.1975

BERNARDO UNGRIA

P.P.

10



15

20

25

30

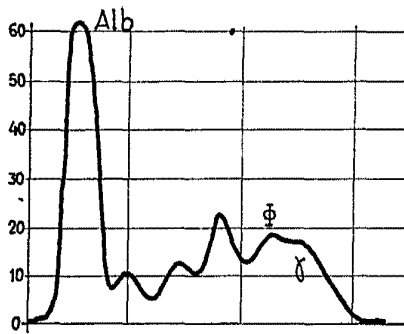


FIG-1

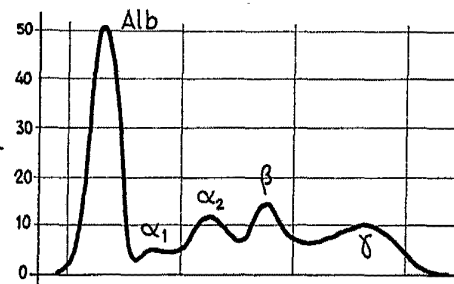


FIG-2

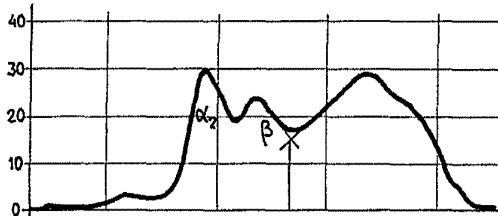
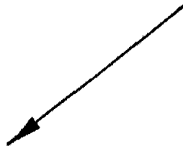


FIG-3

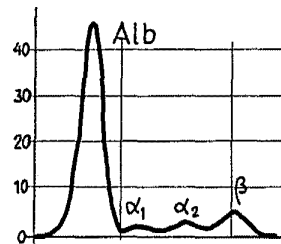


FIG-4

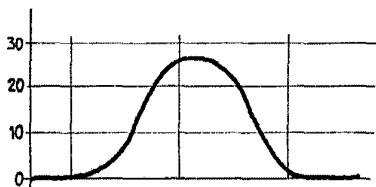


FIG-3'

ESCALA VARIABLE

Madrid, 30 de abril de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. P.

Handwritten signature