

A37378

Int. Cl. C07K 3/02; 3/28 // A61K 39/395

~~Int. Cl. C07G // A61K~~

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: INSTITUTO LLORENTE, S.A.

RESIDENCIA: Gral. Rodrigo, 6-4ª planta

MADRID (3)

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE

INMUNOGLOBULINA A PARTIR DE PLASMA

HUMANO O DEL PRECIPITADO CORRESPON-

DIENTE A LA FRACCION 11 & 111 DEL  
METODO COHN

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 y en el proceso de electrodecantación multimembrana, 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 Harvar 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-  
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            puestas 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 (c) Terapéutico: Las propiedades antitóxicas y anti-infecciosas de la inmunoglobulina homóloga, así como su utilidad en estados deficitarios en inmunoglobulina (Ig) son bien conocidas. Se ha trabajado mucho en la formulación de preparados de inmunoglobulina de "liberación lenta" que puedan inyectarse intramuscularmente. Uno de los problemas a superar es, sin embargo, la degradación que los sistemas enzimáticos del cuerpo producen en la proteína inyectada durante este periodo de "liberación lenta". Martin du Pan y colaboradores demostraron que esto produce una notable disminución en la eficacia potencial de los preparados de inmunoglobulina. En consecuencia, todos los preparados a inyectar intramuscularmente presentan el problema de bajo rendimiento tanto económico como terapéutico. La solución está en la administración intravenosa, pero esto hace surgir nuevas dificultades incluyendo la cuestión de la seguridad. Los preparados de uso intravenoso obtenidos por el método Cohn necesitan un tratamiento complicado que compromete la potencia inmunológica y además incrementa el costo. Además, se sabe que los disolventes orgánicos de uso ordinario además de modificar la frágil estructura de la molécula de gamma-globulina, pueden producir agregados moleculares que, por su actividad anticomplementaria dan un carácter marcadamente tóxico a los preparados cuando se administran intra-

10

15

20

25

30

venosamente.

1                   En consecuencia, el valor potencialmente grande  
de la terapia con gamma-globulina intravenosa homóloga se  
ve restringido por los riesgos de reacciones vasomotoras,  
5                   debidas a la administración intravenosa de preparados que  
contienen agregados moleculares formados durante el curso  
de la preparación (Stephan y colaboradores).

                  Steinbuch y colaboradores observaron en 1969  
que: "Estudios sistemáticos han demostrado que las prepara-  
10                   ciones de inmunoglobulina hechas por fraccionamiento indus-  
trial del plasma tienen siempre una proporción más o menos  
elevada de gamma-globulina desnaturalizada que hace al pro-  
ducto anticomplementario". Stephan y colaboradores han rea-  
lizado un estudio comprensivo de revisión de los proble-  
15                   mas presentados por las distintas técnicas utilizadas para  
impedir la agregación molecular. Sin embargo, el problema  
inherente a la eliminación de la actividad anticomplementa-  
ria de la inmunoglobulina sérica es de tal naturaleza que  
limita drásticamente la producción de inmunoglobulinas ade-  
20                   cuadas para uso intravenoso.

                  Los sistemas clásicos de producción en uso no  
son capaces de asegurar la cantidad y calidad en la preci-  
pitación fraccionada de las proteínas séricas humanas. Es  
casi imposible aislar cuantitativamente cualquiera de estas  
25                   proteínas en estado puro. Esto se debe a que no existen con-  
diciones 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 con-  
tinuo y antes de que se precipite por completo una proteína  
30                   individual, otras proteínas de la mezcla empiezan a precipi

1 tar. 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.

5 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.

10 COMPENDIO DE LA INVENCION

15 Durante los últimos años, los autores de esta invención, han desarrollado una técnica adecuada al fraccionamiento a escala industrial. Esta técnica, que tiene grandes ventajas, se basa principalmente en el poder individual de ciertos polímeros para desplazar partículas coloidales en solución. Incluye procedimientos físicos suaves que evitan las precipitaciones fraccionadas mientras que el mecanismo de "exclusión en el espacio" asegura el desplazamiento de moléculas coloidales de proteínas sin perjudicar a su estructura molecular intrínseca.

20 Para aislamiento cuantitativo parece razonable acudir a procedimientos basados estrictamente en propiedades físicas de mezclas proteicas. De momento, las técnicas más útiles empleadas para conseguir una precipitación más efectiva y más definida se han basado en diferencias en las constantes de sedimentación en el intervalo de pesos moleculares y en las diferentes movilidades electroforéticas. Desgraciadamente, la ultracentrífuga no se ha adaptado todavía al uso industrial para estos fines. De igual modo, la cromatografía

1 tografía de columna y la gel filtración no se han adaptado  
todavía al fraccionamiento a gran escala. Por lo tanto, so-  
lo se dispone de procedimientos electroforéticos para la pro-  
ducción a gran escala que a la vez sea económica.

5 Polson introdujo la técnica de electrodecanta-  
ción multi-membrana. En este proceso es posible eliminar  
una proteína individual en estado puro a partir de una mez-  
cla tamponada haciéndola circular a través de un campo eléc-  
trico. El tampón se ajusta al punto isoeléctrico de la molé-  
10 cula de proteína en cuestión de modo que la proteína permanezca  
neutra e inmóvil, mientras el resto de las proteínas  
emigrarán electroforéticamente y podrán ser recogidas por  
decantación. Está claro que una proteína separada en esas  
condiciones no se ha expuesto a ninguna forma de agresión  
15 química o física y así se obtiene en un estado inalterado.

Utilizando electrodecantadores adaptados al pro-  
ceso, los autores han desarrollado un sistema continuo para  
extracción de una proteína individual a partir de suero hu-  
mano. Esta técnica se puede usar a nivel industrial para pro-  
20 ducir inmunoglobulinas que no han soportado desnaturalización  
y así conservan el mismo nivel de potencia que tenían en el  
plasma original. Al ser un proceso continuo que asegura la  
extracción total de la proteína requerida de la solución  
inicial, permite obtener en la industria rendimientos cuan-  
titativos con una calidad excelente. Combinando esta técni-  
ca con un sistema de exclusión por polímeros, se evitan los  
largos y complicados procesos de purificación, concentra-  
ción y diálisis final. La esencia del proceso reside en la  
combinación particular de etapas sucesivas de exclusión por  
25 polímeros y electrodecantación que se combina con otras ope-

1 raciones físicas, convencionales, para aumentar su eficacia.

PARTE EXPERIMENTAL

5 Mediante el procedimiento de esta invención es posible el aislamiento de  $\gamma$ -globulina en estado de gran pureza y con altos rendimientos.

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

El procedimiento seguido es el siguiente:

15 Se utiliza como material de partida plasma humano exento de antígeno Australia. Al mismo se añade una solución de cloruro cálcico al 10% para coagular el fibrinógeno. Se separa el suero del precipitado por decantación y se añade al primero sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ajustado al pH entre 7,5 y 8,6 con cristales de fosfato trisódico. La Figura 1 representa el diagrama electroforético del plasma de partida conteniendo todas las proteínas, mientras que la Figura 2 es el diagrama electroforético del suero exento de fibrinógeno observándose la desaparición del pico correspondiente a este último. Al suero mantenido a pH 7,5-8,6 se agrega entonces, de forma continua pero no brusca, un volumen igual de una solución 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 (SED-1 g) que contiene la  $\gamma$ -globulina (también llamada inmunoglobulina) y cantidades menores de  $\alpha_2$  y  $\beta$ -globulinas así como una pequeña cantidad de albúmina; el líquido que sobrenada.

20

25

30

1 (SNF-1A) contiene la mayor parte de albúmina y pequeñas can-  
tidades de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ -globulinas. El sedimento se separa  
del líquido sobrenadante por centrifugación. Las figuras 3  
y 4 representan, respectivamente, los diagramas electrofo-  
5 réticos del sedimento SED-1G redissuelto en tampón a pH 6,9  
del líquido sobrenadante, y del SNF-1A. En este último, el  
pico de la izquierda es el correspondiente a la albúmina.

El SED-1G se disuelve en agua destilada y se  
ajusta el pH a 5,8 con ácido fosfórico diluido. Se centrifu-  
ga la mezcla y se recoge el líquido que sobrenada (SNF-2G)  
10 que contiene las globulinas. El sedimento contiene lipopro-  
teínas, fosfato tricálcico y otras impurezas y es desechado.  
Se ajusta a 6,9 el pH del SNF-2G se lleva al volumen adecua-  
do con tampón fosfatos especial de pH 6,9 y fuerza iónica  
15 final de 0,015 ( $\pm$  0,002) y se filtra por placas clarifican-  
tes de carbón y a continuación por placas esterilizantes. A  
continuación la solución se somete a electrodecantación en  
el punto isoeléctrico de la inmunoglobulina, a través de men-  
branas múltiples en un proceso continuo. Se recoge el efluen-  
te isoeléctrico (IE) que se somete a concentración final y  
20 desionización por exclusión total con PEG. Finalmente el pro-  
ducto se somete a filtración clarificante y liofilización y,  
si se desea, se separan las trazas de PEG por extracción con  
cloroformo. Si el efluente isoeléctrico se somete directa-  
mente a liofilización, se obtiene una  $\gamma$ -globulina exenta  
25 de otras proteínas pero con algunos iones que no ejercen  
ningún efecto. La Figura 3' es un diagrama electroforético  
de la inmunoglobulina con una pureza del 100%, concentrada  
y liberada de los iones del tampón por exclusión con PEG  
30 6000.

1 También es posible aplicar este procedimiento -  
al precipitado 11 & 111 obtenido según el método standard -  
Cohn de alcohol a baja temperatura.

5 Este precipitado es de composición similar al -  
SED-1G obtenido según se describe en párrafos anteriores; y  
debe ser tratado de la misma manera.

10 Es de notar que aplicando nuestro procedimiento  
de electrodecantación al precipitado 11 & 111 de Cohn, se -  
obtienen ventajas sustanciales en cuanto al rendimiento fi-  
nal en inmunoglobulina y en cuanto a sus características -  
físico-químicas, que si se siguieran con el propio procedi-  
miento Cohn; tal y como se detalla en páginas anteriores de  
esta misma Memoria descriptiva.

#### EJEMPLO 1

15 Se añade cristales de fosfato trisódico a un sue-  
ro de plasma diluído 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. El precipitado que se forma contiene toda la -  
20  $\gamma$ -globulina junto con algo de  $\alpha_2$  y  $\beta$ -globulinas y una peque-  
ña cantidad de albúmina que queda oculta en el precipitado.  
El precipitado se centrifuga y se sigue procesando para ob-  
tener inmunoglobulina. El líquido que sobrenada se conserva  
para producir albúmina.

25 La inmunoglobulina se puede obtener con buenos  
rendimientos por electrodecantación del precipitado redissuel-  
to en tampón fosfato a pH 6,9. A esa concentración de hidro-  
geniones, las inmunoglobulinas son isoeléctricas y permane-  
cen en el líquido sobrenadante del electrodecantador o pa-  
san por el aparato cuando el flujo es continuo. Las proteí-  
30 nas restantes, que comprenden la  $\beta$  y  $\alpha_2$ -globulinas, se con-

1 centran en las regiones inferiores de las células. Este -  
concentrado sirve de fuente para otros componentes del plas  
ma con movilidades en la zona de las  $\alpha$  y  $\beta$ .

EJEMPLO 2

5 1. Coagulación del fibrinógeno

Al plasma exento de antígeno Australia descon  
gelado se añade una solución de cloruro cálcico al 10% (10  
cc por litro de plasma). Cuando se considera necesario ace  
lerar el proceso de coagulación, se incluye en el lote de  
10 10 a 15 l de plasma fresco o congelado muy reciente. Se es  
pera a que la gelificación sea total. El plasma se ha de -  
mantener entre 4 y 8<sup>o</sup> C. El coágulo se tritura (con peque  
ñas interrupciones) hasta partícula fina flotante. Se de  
canta el suero claro a través de una malla inoxidable del -  
15 n<sup>o</sup> 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 líquido de lavado de la fibrina hasta 250 litros. El  
suero se mantiene entre 4 y 8<sup>o</sup> C.

20 11. Exclusión previa

1. Secuestro de iones metálicos y ajuste de pH

Una vez aforado a 250 litros el suero, se di  
suelven en el mismo 400 g de EDTA sódico. Se ajusta el pH -  
a 8,6 con cristales de fosfato trisódico. Se agita y se man  
25 tiene la temperatura entre 4 y 8<sup>o</sup> C.

2. Exclusión

Se añade de forma continua, aunque no brusca, -  
por cada 100 l de suero, 100 l de solución estéril de PEG -  
6000 al 30% p/v y pH 8,6 (ajustado con fosfato trisódico).  
30 Se agita durante 5 minutos.

1                   3. Centrifugación

Se centrifuga el contenido del reactor (500 l),-  
alimentando las centrifugas por medio de una bomba que  
asegure un caudal y una presión constante durante todo -  
el proceso. Todas las piezas desmontables de la instala-  
ción deben estar estériles y despirogenadas a calor seco.  
La temperatura de los cilindros interiores de recogida -  
de las centrífugas se mantiene entre 4 y 8º C. El sedimen-  
to centrifugado se recoge en condiciones estériles, Se -  
pasa a un reactor para su disolución. El sobrenadante (-  
(SNF-1A) se recoge aparte y de forma estéril, destinándo-  
se a la obtención de albúmina.

15                   4. Redisuspensión del SED-1G o del precipitado  
11 & 111 del método Cohn procedente también  
de 250 l de plasma humano.

Se desmenuza mecánicamente el SED.1 G lo más -  
posible en el seno de agua destilada estéril, apirógena y  
fría (4-8º C). La mezcla ha de ocupar un volumen de unos  
240 l. Se deja en inhibición (con agitación intermiten-  
tes) hasta la mañana siguiente. Se redisuelve hasta sus-  
pensión homogénea, evitando la formación de espuma con -  
Antifoam estéril y/o vacío.

25                   111.- Proceso de obtención de  $\gamma$ - globulina. Tratamiento -  
del SED-1G o del precipitado 11 & 111 del método -  
Cohn procedente también de 250 l. de plasma humano

1. Ajuste del pH

Se ajusta el pH a 5,8 con  $\text{PO}_4\text{H}_3$  diluido y agi-  
tando. Se transvasa bajo presión de nitrógeno filtrado a  
un reactor.

30                   2. Centrifugación

1 Se centrifuga el contenido del reactor (240 l aproximadamente), manteniendo las mismas condiciones de la operación 11. Se recoge el sobrenadante (SNF-2G) en condiciones estériles. El sedimento insoluble (SED-2G) debe ser -  
5 recogido asepticamente y congelado. Cuando, después de fraccionar varios lotes, se ha recogido una cantidad apreciable de SED.2G estos pueden resuspenderse en el menor volumen posible de tampon especial para MMED:

Composición:

10	PO <sub>4</sub> HNa 2.2H <sub>2</sub> O	25,29 g
	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.H <sub>2</sub> O	21,78 g
	Glicocola	98,84 g
	Citrato sódico. 2H <sub>2</sub> O	9,67 g
	Agua destilada apirógena c.s.p.	50 litros
15	pH .	6,9

La suspensión turbia se centrifuga en las condiciones establecidas y el sobrenadante (SNF-3G) se incorpora entonces el SNF-2G que está en proceso en ese momento o se emplea para lavar los filtros, de la fase 4. El SED-3G se -  
20 desecha sí, previo control electroforético, se observa que contiene una cantidad despreciable de inmunoglobulinas (en caso contrario, se repetiría el lavado por centrifugación).

3. Ajuste de pH y concentración. Aforo

25 El SNF-2G debe ser tamponado, aforado y ajustado en proteínas en la misma operación. Para elb, primero - se ajusta el pH a 6,9 con hidróxido sódico y después se afora a 250 l, bien con solución madre concentrada de tampón - MMED (MULTIMEMBRANA DE DECANTACION) y agua destilada estéril apirógena, o bien con los productos sólidos de que se -  
30 compone dicho tampón. La solución centrifugada y a pH ajustado

1 tado se deja en nevera (4-5°C) para completar la precipi-  
tación de  $(PQ_4)_2Ca_3$ .

#### 4. Filtración

5 Se clarifica y se filtra asepticamente. Se  
mantiene una relación máxima de 300 l por m<sup>2</sup> de superficie  
filtrante esterilizante. La solución final debe tener las  
siguientes características:

Transparencia y opalinidad "sui géneris"

Concentración de proteínas: 3 % ( 0,5)

10 Contenido en inmunoglobulinas (según proteino-  
grama): 50% ( $\pm$  10)

Zona de tampón : pH 6,9 ( $\pm$  0,1)

Volumen: 250 l ( $\pm$  10%)

Fuerza iónica: 0,015 ( $\pm$  0,002)

15 Conductividad: 1 mmho/cm ( $\pm$  0,05)

Pirogenicidad: debe cumplir los requisitos -  
mínimos para inmunoglobulinas.

#### 1V.- Electrodecantación

20 Una vez aseguradas las anteriores caracteris-  
ticas, a medida que se va obteniendo la solución filtrada -  
se somete a electrodecantación en el punto isoeléctrico de  
la inmunoglobulina, utilizando las siguientes condiciones:

Número de células de decantación: 7

Número de células de refrigeración: 8

25 Espaciadores: cinta P-3 de 0,8 mm

Caudal por célula: 280 cc/hora ( $\pm$  20)

Corriente eléctrica: 330 voltios y 1 amperio  
con márgenes de  $\pm$  10%

30 Recogida automática y espontánea de efluen-  
tes no isoeléctricos decantados.

1

Sistema de bombeo aspirante-impelente

Alimentación de células en paralelo

Temperatura del tampón a la entrada en las células: 4<sup>o</sup> C (± 1<sup>o</sup> C)

5

Temperatura máxima de salida de los efluentes - isoelectrónicos: 10<sup>o</sup> C

Temperatura de la solución de alimentación: 4<sup>o</sup> C (± 1<sup>o</sup> C)

10

El efluente isoelectrónico (IE) ha de recogerse asépticamente en recipientes estériles y despirogenados. La temperatura debe mantenerse alrededor de los 4<sup>o</sup> C. Todo el material y piezas utilizadas en esta operación debe estar esterilizados y despirogenados según normas especiales.

15

La recogida del efluente no IE se inicia cuando en el fondo de las células de decantación se hace evidente una alta concentración de proteínas. La recogida se realiza por simple caída libre (goteo), La concentración en proteínas debe ser superior al 15%.

20

Se recogen los efluentes IE en reactor estéril - despirogenado hasta completar unidades de 250 l (cada 5 días aproximadamente), Se agita y homogeneiza.

V.- Concentración, purificación y desmineralización del IE

25

1. Exclusión

Se excluye con PEG en polvo (previamente controlado) a pH 6,9 (± 0,1) según la siguiente relación:

Si la concentración de proteínas está entre:

La concentración de PEG en % p/v debe ser:

0,2- 0,5 %

15 %

0,5- 1 %

11 %

30



1 ro inoxidable. Se recoge asépticamente el producto seco lio-  
filizado.

VII.- Tratamiento final

1. Eliminación del PEG residual

5 El producto liofilizado anterior se suspende -  
en 5-l de cloroformo Q.P., seco y frío. Se agita la suspen-  
sión a 6-7° C durante 10 minutos. Se filtra a vacío lenta-  
mente y se escurre bien el cloroformo. Se vuelve a desleir  
10 el liofilizado en 5 l de cloroformo Q.P., seco y frío. Se  
filtra de nuevo. Se elimina al máximo el cloroformo y el -  
liofilizado se recoge en bandejas inoxidables y en capa fina,  
sin grumos.

2. Secado

15 Se seca a vacío en estufa estática a 20° C -  
durante 3 horas hasta desaparición absoluta del cloroformo.

En lugar de las operaciones V+VI+VII se puede  
proceder a una liofilización directa para obtener  $\gamma$ -globu-  
lina exenta de otras proteínas pero conteniendo algunos io-  
nes.

20

EJEMPLO 3

Recuperación del PEG

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

25

Para lograrlo, se baja el pH a 4,2 con ácido -  
fosfórico y se centrifuga. Luego, la mayor parte del PEG -  
se separa por extracción del concentrado de polímero con -  
cloroformo. El PEG y el cloroformo pueden entonces recupe-  
rarse por destilación de la solución. El coeficiente de -  
distribución del PEG entre el cloroformo y el agua es del -  
30 orden de 11:1. Así pues, más del 90 % del polímero puede -

1 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 polímeros y electrodecantación tiene sobre el método del crio-  
tanol son las siguientes:

- a) puede realizarse a temperaturas superiores a 0° C.
- b) no se emplean sustancias químicas que pueda perjudicar -  
a los componentes del plasma (el uso de cloroformo es op-  
cional y además se emplea sobre producto seco totalmente  
10 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 procedimiento  
del criotanol, obteniéndose la pureza aceptada por todas  
15 las farmacopeas. En algunos casos, se ha obtenido un ren-  
dimiento del orden de un 40 % superior al obtenido con -  
otros procedimiento convencionales de obtención de  $\gamma$ - glo-  
bulina.
- d) el polímero (PEG) puede recuperarse casi por completo -  
20 de la solución madre para volver a ser utilizado, por ex-  
tracción con cloroformo.
- e) las  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - y  $\beta$ -globulinas se separan de forma que su es-  
tructura molecular permanece inalterada, lo que permitirá  
su futura aplicación clínica una vez que ésta sea desarro-  
25 llada, como está previsto.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

- 1. UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE INMUNOGLO-  
30 BULINA A PARTIR DE PLASMA HUMANO O DEL PRECIPITADO CORRESPON

1 DIENTE A LA FRACCION II & III DEL METODO COHN, por exclu-  
sion con un polimero y electroforesis, que consiste en:

5 A) añadir al plasma humano, exento de antigeno  
Australia, una solucion de cloruro calcico para coagular -  
el fibrinogeno; separar el suero del precipitado por decan-  
tacion y añadir al primero sal sodica de acido etilendiami-  
notetraacetico, ajustando el pH entre 7,5 y 8,6 con crista-  
les de fosfato trisodico, agregar despues al suero, de for-  
ma continua pero no brusca, una solucion esteril de PEG -  
10 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 liqui-  
do sobrenadante (SNF-1A) que se separan por centrifugacion:

15 B) disolver en agua destilada el SED.1 G obte-  
nido segun el punto A, o bien el precipitado II & III obte-  
nido segun el metodo standard Cohn de alcohol a baja tempera-  
tura, y ajustar el pH de cualquiera de los dos precipitados  
a 5,8 con acido fosforico diluido; centrifugar la mezcla -  
y recoger el liquido que sobrenada (SNF-2G), que se ajusta  
a pH 6,9 y se lleva al volumen adecuado, con tampón espe-  
20 cial, filtrandolo despues a traves de placas clarificantes  
de carbon y a continuacion a traves de placas esterilizan-  
tes; someter la solucion obtenida a electrodecantacion, en -  
el punto isoelctrico de la inmunoglobulina, a traves de -  
membranas multiples, en un proceso continuo; recoger el -  
25 efluente isoelctrico y someterlo a concentracion final y  
desionizacion por exclusion total con PEG; finalmente some-  
ter el producto a filtracion clarificante y liofilizacion y,  
opcionalmente, separar las trazas de PEG por extraccion con  
30 cloroformo, obteniendose asi la inmunoglobulina pura;

2.- Se reivindica por ultimo como objeto so-

1 bre el que ha de recaer la Patente de Invención que se so-  
licita por: UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE INMUNOGLOBU  
LINA A PARTIR DE PLASMA HUMANO O DEL PRECIPITADO CORRESPON  
DIENTE A LA FRACCION 11 & 111 DEL METODO COHN.

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

Madrid, 30 Abril 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.

10



15

20

25

30

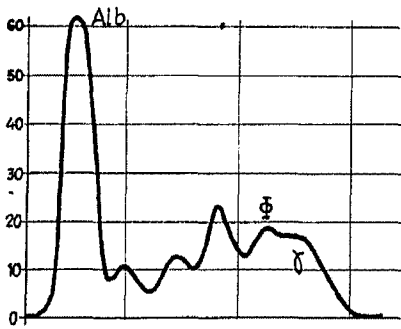


FIG-1

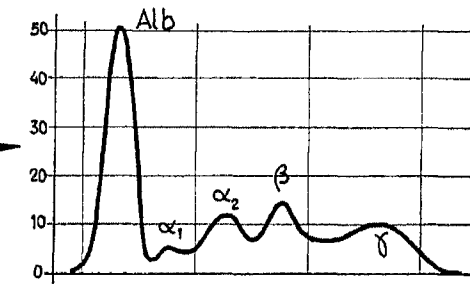


FIG-2

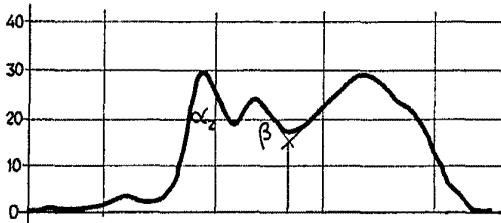


FIG-3

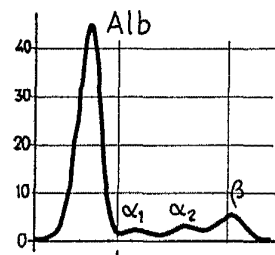


FIG-4

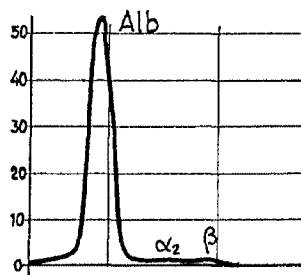


FIG-5

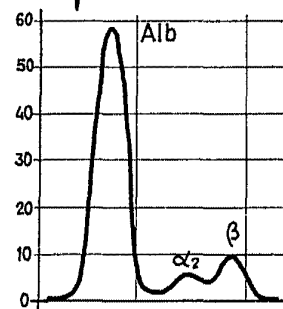


FIG-4'

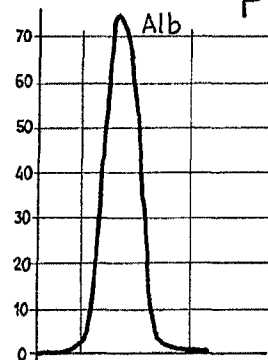


FIG-6

ESCALA VARIABLE

Madrid, 30 de abril de 1975

BERNARDO UNGRIA

p. p.