



Int. Cl.: Bo1D

PATENTE DE INVENCION

Stern-1.

437403

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA EL FRACCIONADO
DE SOLUCIONES LIQUIDAS DE MEZCLAS
DE PROTEINA

Solicitante: HAROLD STERN, de nacionalidad norteamericana,
residente en Llewellyn Park, West Orange,
New Jersey 07052, EE. UU. de A.

La presente solicitud se relaciona con un procedimiento para la separacion de mezclas complejas de proteina, mas particularmente al fraccionado y resolucion parcial de tales mezclas por combinacion de electrodiálisis y, como mínimo, una de las siguientes etapas: electroforesis de flujo forzado, elec-



trodecantacion y precipitado con alcohol.

Fluidos biológicos normalmente contienen una mezcla de varias proteínas, y uno de los principales logros de la bioquímica moderna es el haber conseguido métodos para su separación. El mejor ejemplo es plasma sanguínea o suero, para el cual existen métodos para la identificación y separación de, como mínimo, 25 componentes principales de proteína (Schultze and Hermans: Molecular Biology of Human Proteins, Elsevier, 1966). Otros ejemplos de mezclas complejas de proteína, de ocurrencia natural son leche o suero, orina, fluidos vertebrales, clara de huevo, etc.

Para el objeto de la presente memoria, es conveniente definir la siguiente nomenclatura de proteína, estando basada su clasificación en su solubilidad en una variedad de disolventes: (1) albúmina es el principal componente proteínico de plasma, suero y clara de huevo, y se caracteriza por ser soluble tanto en sulfato de amonio saturado al 50% cuanto en agua destilada; (2) globulinas son aquellas proteínas de plasma u otros fluidos biológicos que se precipitan en sulfato de amonio saturado al 50%; (3) euglobulinas son aquellas globulinas que no solo se precipitan en sulfato de amonio saturado al 50% sino también en agua desionizada, ya que aparentemente requieren algo de sal para ser solubles. Obviamente, esta clasificación es arbitraria, aunque extensamente usada en la química de proteína, ya que la solubilidad de todas las proteínas depende igualmente del pH de la solución, de la temperatura, y de otros solutos presentes, tal como alcohol; (4) materiales tipo euglobulina; la expresión "tipo euglobulina" se utiliza aquí para aquellas proteínas que precipitan en soluciones acuosas desionizadas únicamente en presencia de varias cantidades de



alcohol. Estas proteínas no son verdaderas euglobulinas, siendo solubles en agua desionizada en ausencia de alcohol, aunque poseen algunas de las características de las euglobulinas, siendo disolubles por incluso bajas concentraciones de sales.

5 Sera conveniente definir, en cuanto a la presente invención se refiere, los siguientes procesos de membrana eléctrica:

(1) Electrodialisis se utiliza principalmente para la desalación de soluciones acuosas. Normalmente, esto se consigue por medio de membranas iónico-selectivas, dichas membranas permitien-

10 do el paso preferente de iones bien de carga positiva o bien de carga negativa, según se describe en una variedad de Patentes de los EE. UU. de America, incluyendo la 2.694.680, 2.848.402, 2.860.091, y 2.777.811. La utilidad de esta técnica para la separación de proteínas no ha sido reconocida anteriormente.

15 Las membranas iónico-selectivas también pueden ser sustituidas por membranas esencialmente neutras eléctricamente, con inclusión de polielectrolitos en algunos compartimentos, polarizándose dichos polielectrolitos a lo largo de las membranas bajo la influencia de un campo eléctrico, así trasladando a

20 las membranas neutras un elemento de iónico-selectividad según enseña la Patente de EE. UU. 3.677.923 y la 3.725.235. En otros procesos de membranas eléctricas, detalladas en las siguientes dos secciones, algo de electrodialisis inevitablemente se superpone a otros efectos buscados, siendo un resultado directo del paso de corriente eléctrica. A efectos de la

25 presente invención, la expresión "electrodialisis" se reservará para estos procesos eléctricos, el principal objetivo de los cuales siendo la desalación, preferencialmente efectuada bien con membranas iónico-selectivas o bien con el uso de polie-

30 lectrolitos.



(2) Electrodecantacion es un proceso eléctrico para la concentración y separación de una variedad de coloides incluyendo proteínas, según enseñan las Patentes de EE. UU. Nos. 2.057.156, 2.292.608, 2.762.770, 2.800.448 y 2.801.962. Estos enseñan dispositivos que contienen una multitud de membranas principalmente neutrales eléctricamente en una disposición paralela, acumulándose los coloides o las proteínas por influencia de la corriente o campo eléctrico en los inmediatos alrededores de dichas membranas y son decantables a lo largo de dichas membranas como resultado de los gradientes de densidad. Un proceso análogo es conocido frecuentemente como electroforesis-conveccion (en la Patente de EE. UU. No. 2.758.966), donde normalmente solo un par de membranas eléctricamente neutrales es empleado para el fin de crear electrodecantación en la solución de proteína. Estas técnicas han sido utilizadas extensamente para el fraccionamiento de proteína, principalmente para la preparación de gamma globulinas, estas proteínas de plasma siendo isoceléctricas y no decantables. Esta técnica no ha sido enseñada para la preparación de suero de albúmina, la más móvil de las proteínas de plasma (en términos de electroforesis). Entre los objetivos de la presente memoria está el de enseñar la utilización de tales técnicas de fraccionamiento para la preparación de suero de albúmina.

(3) Electroforesis de Flujo Forzado incluye dispositivos similares a aquellos para la electrodecantación, que también utiliza una fila paralela de membranas eléctricamente neutrales, pero las particiones están dispuestas entre pares de membranas adyacentes. Dichas particiones permiten mejor control de los módulos de flujo dentro del aparato, y también para actuar como barreras de difusión. Dos tales dispositivos de electroforesis



se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 2.878.178 y 3.079.318, y tambien se describe la técnica como "electroforesis de flujo forzado" por M. Bier; "Electrophoresis", Academic Press, 1959, página 295.

5 Los procesos de electrodecantacion y electroforesis de flujo forzado son similares en principio y resultados y, a efectos de conveniencia, se mencionaran como separaciones por campo eléctrico en lo sucesivo. Según se detallan a continuacion, estos pueden ser utilizados intercambiamente.

10 Los productos proteínicos mas importantes del comercio son aquellos obtenidos de plasma o suero humano o animal. Dos tales proteínas, suero de albúmina y gama globulinas, bien de origen humano o bien de origen animal, seran utilizadas como ejemplos principales pero el alcance de esta invencion tambien
15 puede ser aplicado a otros fluidos biológicos u otras proteínas sin modificar. Los procesos comerciales actuales para la obtencion de estas fracciones estan basadas en fraccionado alcohólico, un proceso desarrollado por Cohn et al y descrito en las Patentes de EE. UU. Nos. 2.390.074 y 2.770.616. Esta técnica
20 esta basada principalmente en precipitacion por etapas de varias fracciones por alcohol, bajo condiciones controladas de temperatura, contenido alcohólico, pH, y contenido de sal, según se resume en Internal Med. 3, 295, 1949, de C.A. Janeway. Esta técnica requiere una instalacion grande, el producto obtenido de ciertas fracciones es pequeño, requiere exposicion pro-
25 longada de las proteínas a elevados contenidos alcohólicos, que tiene un efecto de desnaturalizacion sobre algunas fracciones de proteina. La técnica tambien esta limitada a la produccion de unicamente ciertas fracciones de plasma; otras fracciones
30 de proteina no son recuperables en concentraciones suficientes.



La presente invencion se relaciona con el fraccionado y resolucion parcial de mezclas de proteina, principalmente mezclas tal como, pero no exclússivamente, plasma, suero, o sus fracciones derivadas, utilizando uno o mas de los procesos definidos anteriormente, todos eléctricos, bien por si solos o en combinacion unos con otros, y en combinacion con fraccionado con alcohol. El esquema de fraccionado de esta invencion permite una flexibilidad mas amplia en términos de fracciones obtenibles según los procesos eléctricos puedan reemplazar algunas o todas las etapas de fraccionado en el fraccionado convencional por alcohol, resultante en sustanciales ahorros en dinero, tiempo, costos de instalacion y en proporcionar superior rendimiento de productos. Mas especificamente, la invencion comprende: (1) el proceso de fraccionado de proteninas incluyendo plasma o fracciones de plasma, caracterizado porque comprende causar la precipitacion de una fraccion de euglobulina por medio de desalacion electrodiálitica bajo condiciones controladas de temperatura, pH, y conductividad, y la posterior recuperacion del dialisato; (2) el proceso de fraccionado de proteinas incluyendo plasma o fracciones de plasma, caracterizado porque comprende precipitar una fraccion tipo euglobulina por medio de desalacion electrodiálitica bajo condiciones controladas de temperatura, pH, conductividad y contenido de alcohol; (3) el proceso de fraccionado de proteninas incluyendo plasma o fracciones de plasma, caracterizado porque comprende preparar un precipitado de tipo euglobulina por desalacion electrodiálitica bajo condiciones controladas de temperatura, pH, conductividad y contenido de alcohol, seguido por la disolucion selectiva de una fraccion enriquecida con albúmina por el reajuste de temperatura, pH, conductividad o contenido de alcohol;



(4) proceso de fraccionado de plasma, caracterizado porque comprende las etapas de primeramente una primera precipitacion por alcohol, una segunda etapa de desalacion electrodiálitica del sobrenatante de la primera precipitacion, dicha segunda etapa causando la precipitacion de una fraccion tipo euglobulina, una tercera etapa opcional que comprende la disolucion selectiva de una fraccion rica en albúmina de dicho precipitado tipo euglobulina, y una última etapa de precipitacion con alcohol de una fraccion rica en albúmina de los sobrenatantes combinados de la etapa de desalacion electrodiálitica o, alternativamente, de los sobrenatantes combinados de la segunda etapa y de la tercera etapa opcional del fraccionado; (5) proceso para mejorar el fraccionado de mezclas de proteina por electrodecantacion o electroforesis de flujo forzado, caracterizado porque comprende la reduccion de su contenido en sal por desalacion electrolítica anterior, dicha desalacion causando igualmente la precipitacion de euglobulinas o materiales tipo euglobulina; (6) procedimiento para mejorar el fraccionado de mezclas de proteina por electrodecantacion o electroforesis de flujo forzado, caracterizado porque comprende la reduccion de su contenido de sal por desalacion anterior, y adiccion posterior de sal de amortiguacion, dicha sal amortiguadora siendo una amfolita tal como glicina, dicha desalacion causando tambien la precipitacion de euglobulinas; (7) proceso de fraccionado de plasma, caracterizado porque comprende una primera precipitacion por alcohol, una segunda etapa de desalacion electrodiálitica del sobrenatante de dicha primera precipitacion, dicha segunda etapa causando la precipitacion de una fraccion tipo euglobulina de dicho precipitado tipo euglobulina, y una última etapa que comprende la concentracion selectiva de una



fraccion rica en albúmina por medio de electrodecantación o flujo forzado del sobrenatante de la etapa de desalación o alternativamente los sobrenatantes combinados de la desalación y la tercera etapa selectiva de fraccionado; (B) productos de fabricación apropiados para su uso de extensor de plasma, y comprendiendo por lo menos 90% de la albúmina, obtenidos por los procesos detallados anteriormente, particularmente por los procesos 4 6 7.

Estos y otros aspectos de la invención se apreciarán mejor con la descripción detallada a continuación.

A-Electrodialisis se utiliza extensamente para la desalación de soluciones acuosas. En el campo de proteínas se ha utilizado en la desalación de leche, suero (patentes U.S.A. 3.433.726; 3.447.930; 3.595.766; 3.757.005; 3.754.650), pero estas patentes no tienen relación con la presente invención, ya que solo tratan de la reducción del contenido de sal del suero, y no con la incorporación del proceso de desalación en un esquema complejo de fraccionado.

También es bien conocido que la desalación causa la precipitación de euglobulinas. Las patentes U.S.A. 2.669.559; 2.761.809; 2.761.811; 3.234.199 y 3.429.867 detallan la aplicación de desalado por medio de lechos de resina para el intercambio de iones, para el fraccionado de plasma, pero este proceso tiene una flexibilidad demasiado limitada en términos de productos obtenibles para ser de valor práctico significativo. Adicionalmente, columnas intercambiadoras de iones son difíciles de mantener en estado apropiado de limpieza y esterilidad para el fraccionado de proteína.

La esencia de esta invención es el descubrimiento de que la desalación electrodialítica puede ser una herramienta valio



sa en un esquema total de fraccionado de plasma, si se utiliza juntamente con otras técnicas, debido a que los resultados de combinar varias técnicas incrementa la utilidad de cada una de un modo anteriormente insospechado.

5 Específicamente:

10 La adición de varias cantidades de alcohol a proteínas desaladas causa la precipitación adicional de proteínas inestables o de tipo euglobulina. El proceso no es exactamente idéntico al fraccionado con alcohol de proteínas, debido a que
15 la calidad y composición de la fracción precipitada es inordinadamente sensible a temperatura, pH, y cantidades mínimas de electrolito, características de todo fraccionado de euglobulina. El valor de este descubrimiento es particularmente significativo debido a que el esquema corriente del fraccionado con
20 alcohol separa, en la primera etapa, una así llamada fracción Cohn II y III, el precipitado comprendiendo la mayor parte de las gama globulinas. El sobrenatante contiene aproximadamente 20% del alcohol en ese momento, y si esto se desala en este instante, uno obtiene un precipitado de fracción tipo euglobulina que contiene la mayor parte de las globulinas restantes
25 de plasma (llamadas alfa y beta globulinas), que son indeseables en la preparación de suero de albúmina. Además, debido al peligro de infección de hepatitis, es muy deseable preparar las gama globulinas en el modo tradicional de fraccionado con
30 alcohol, siendo el producto resultante no infeccioso. Así, el uso de la desalación electrodiálitica encaja en el actual esquema de fraccionado porque proporciona un producto de gama globulina preparado por métodos aceptables en la actualidad, y ofreciendo adicionalmente un camino más corto en la preparación de albúmina. Hepatitis no es un problema en la prepara-



cion de albumina, ya que estos pueden ser pasteurizados por tratamiento con calor según enseñan las patentes USA nos. 2.705.230 y 2.958.628.

5 Adicionalmente, debido a la sensibilidad inordenada a la temperatura, pH y fuerza iónica de la composición de la fracción de euglobulina, esta fracción puede ser utilizada fácilmente para proporcionar una variedad de subfracciones, proporcionando productos útiles para la preparación de otras fracciones de plasma.

10 Las fracciones tipo euglobulina obtenidas a un contenido de 20% en alcohol igualmente contiene una cantidad significativa de albúmina que puede ser recuperada por disolución selectiva ilustrada en los ejemplos. Nuevamente se pueden obtener mas variedades de fracciones de dicha fuente. No es necesario
15 primeramente separar la fracción tipo euglobulina de su sobrenatante para efectuar la disolución selectiva, pero la temperatura, pH, conductividad o contenido de alcohol de la mezcla de proteína desalada puede ser ajustado por una multitud de modos, nuevamente a ser explicado en los ejemplos, ilustrando
20 que se obtiene una herramienta de fraccionado nueva y versátil al combinar los factores anteriormente mencionados de contenido en alcohol, pH, conductividad y temperatura.

Tampoco es necesario que la primera etapa en el fraccionado sea la etapa de precipitación por alcohol, por ejemplo la
25 separación de las fracciones II y III de Cohn. Este procedimiento solamente es el mejor procedimiento al encajar en el esquema actual de preparación de gama globulina. Pero también es posible desalar el plasma en primer lugar, separar o no las euglobulinas formadas, y a continuación añadir alcohol a el
30 plasma formado, para causar precipitación adicional de una frac



cion tipo euglobulina. Esta fraccion tipo euglobulina ya precipita a un contenido en alcohol del 10%, mientras que el fraccionado Cohn requiere un contenido en alcohol del 20% para su primera etapa; así, pueden ahorrarse cantidades significativas de alcohol. Este esquema de fraccionado es particularmente atractivo si solamente se requiere albúmina, y no gama globulinas, como es el caso de muchos sueros de animal, donde la albúmina es el producto mas significativo del comercio. Tambien es util si la separacion de las, asi llamadas, macro-globulinas o inmuno-globulinas IgM es la deseada. Estos se pierden en el esquema de fraccionado por alcohol de Cohn, pero se recuperan facilmente en la primera fraccion de euglobulina, por ser insolubles aun en ausencia de alcohol.

La precipitacion óptima de euglobulinas o proterinas tipo euglobulina ocurre en sus puntos isoeléctricos, el cual es el punto de su mínima solubilidad. Es característico de procedimientos de desalado electrolítico llevados a cabo correctamente que la mezcla final automaticamente viene al pH correspondiente al punto isoeléctrico medio de las proteínas en la mezcla, ya que se extraen todos los iones libres y solamente se retienen proteínas. En el caso de plasma, esto corresponde a un pH de $5,3 \pm 0,2$ unidades de pH. Debido a interaccion proteina-proteina, existe la co-precipitacion de varias proteínas, pero la composicion del precipitado puede ser alterado y modificado ajustando el pH a una gama de valores pH entre 6 y 4,8, así alterando significativamente la composicion del precipitado, y permitiendo la precipitacion selectiva de ciertas proteínas, incluyendo las anteriormente mencionadas macro-globulinas.

La precipitacion de euglobulinas en plasma comienza a una resistencia específica superior a los 1.000 ohms-cm, pero in-



crementa progresivamente hasta la desalacion máxima. Para la mejor fraccionacion de euglobulinas o fracciones tipo euglobulina, se requiere una resistencia superior a los 50.000 ohms-cm, habiendose llevado a cabo la mayor parte de los fracionados entre los 50.000 y 200.000 ohms-cm.

La temperatura juega una parte significativa en la precipitacion de la fraccion tipo euglobulina. La mayor parte del fraccionado se efectua en la gama de temperaturas inferiores a los 5°C, pero el subfraccionado de la fraccion tipo euglobulina puede efectuarse desde los 15°C aproximadamente o menos.

Resumiendo, el fraccionado óptimo de proteínas, por consiguiente, por desalado electrodiálitico se obtiene dentro de las siguientes gamas estrechas de condiciones: temperatura inferior a los 15°C, pH de 5,3 \pm 0,2, resistencia superior a los 100.000 ohms-cm. La influencia de estos parámetros se aprecian mas específicamente en ejemplos reales de fraccionado.

El equipo para efectuar el fraccionado electrodiálitico no es de diseño crítico, y se pueden utilizar varios instrumentos comerciales. La mayor parte de los experimentos mencionados aqui fueron efectuados en instrumentos obtenidos de la Ionics Corp., B Watertown, Mass. Es importante seleccionar correctamente los pares de membranas de intercambio de iones que causen una extraccion proporcional de iones de carga positiva y negativa de la solucion, de este modo evitando cambios excesivos en los valores de pH. Esto se ha obtenido con membranas de la Ionics Corp. Sin duda esto tambien es obtenible con otros instrumentos, y en parte del trabajo se utilizaron aparatos fabricados por nosotros, de modo similar al descrito en las patentes USA nos. 3.079.318 y 3.677.923. Tambien se puede efectuar el desalado utilizando el procedimiento descri-



to en la recien mencionada patenté USA no. 3.677.922, asi evi-
tando la necesidad de utilizar membranas intercambiadoras de
iones.

5 La solucion de proteina se circula continuamente por el
aparato de electrodiálisis, refrigerado por medio de intercam-
biadores de calor, y un campo eléctrico de corriente continua
superpuesta a traves de las membranas para causar la electrodi-
álisis. La salmuera electrolítica baña ambos lados de las mem-
branas, y lentamente se vuelve mas concentrada en sal según re-
10 cibe la sal del plasma. Esta salmuera puede ser de cualquier
composicion normal apropiada. Su composicion o conductividad
no es crítica para el proceso.

En la mayor parte de los fraccionados utilizando membra-
nas intercambiadoras de iones se empleo una solucion de aproxi-
15 madamente 0,5 g/lit de cloruro sódico. Otras soluciones elec-
trolíticas tambien han sido aceptables.

En experimentos basados en membranas electricamente neu-
tras, la "salmuera" fue una solucion al 0,2% de ácido poliacrí-
lico, ajustado a un pH de 6 con hidróxido sódico. Para mejor
20 control de temperatura se enfrían las salmueras por medios de
enfriamiento tal como intercambiadores de calor.

Con un sistema debidamente equilibrado, el pH del plasma
disminuye gradualmente hacia su punto isoelectrico medio de un
pH de $5,2 \pm 0,2$. La precipitacion comienza a una resistencia
25 específica de aproximadamente 1.000 ohms-cm, y un pH de aproxi-
madamente 5,6. Si el producto de partida no es plasma, sino
una fraccion de precipitacion por alcohol de este, la precipi-
tacion ocurre cuando se obtiene una resistencia de aproximada-
mente 6.000 ohms-cm, ya que se han eliminado algunas de las eu-
30 globulinas. En cualquiera de los casos, la precipitacion es



mas completa a la mayor posible desalacion, cuando la resistencia es superior a los 100.000 ohms-cm.

5 La proteina debe circularse vigorosamente a travos de las cámaras apropiadas del aparato electrodiálitico, con el fin de proporcionar la máxima turbulencia dentro del aparato. Esto esta bien establecido en el arte de la electrodiálisis. Una presion de 1757,7 g/cm² fue empleada en la mayor parte de los experimentos. Esta turbulencia tambien es necesaria para evitar la deposicion de proteinas que se precipitan dentro del aparato, así obstuyendo sus conductos al flujo.

10 Para minimizar el problema de obturacion, tambien es posible instalar un centrífugo continuo en el circuito de flujo de la solucion de proteina.

15 La precipitacion de euglobulina es rápida, y su centrifugado completo se obtiene a velocidades relativamente bajas de centrifugado, siendo suficiente unos 2.000 rpm. Esta modalidad tiene ciertas ventajas, ya que permite el fraccionado de euglobulinas según se estan formando, mediante la coleccion y segregacion de los precipitados por separado a diferentes valores de pH o resistencia. Tambien es ventajoso insertar en el trayecto de la circulacion de proteina instrumentos monitores apropiados, de accionamiento automatico o manual, para controlar el pH, la resistencia y la temperatura durante el proceso de desalacion.

25 Si fuera aparente la obturacion de cualquier parte del aparato, según indicaria una repentina subida de presiones, esto puede ser remediado facilmente por adiccion de un agente alcalinizador apropiado, tal como una solucion de hidróxido sódico, en cantidades para elevar el pH de la solucion de proteina por encima de 6. Esto causa la rapida disolucion de todos los

30



precipitados. Esta desopturación no causa gran retraso en el proceso global de desalación. La electrodiálisis de iones de sodio es mucho más rápido que la de cualquiera de muchos otros iones en la solución de proteína. El tiempo global requerido para la desalación total está limitado principalmente por estos iones de electrodiálisis más lentos y no por los iones de sodio. Así, es posible desalar la mezcla de proteína completamente, después de añadir suficiente alcali para disolver nuevamente todos los precipitados (que, por supuesto, reduce la resistencia), y a continuación obtener un producto final en un paso adicional, final, a través del electrodiálizador, por el cual se extrae el hidróxido sódico añadido. Esto evita la acumulación del precipitado en el aparato. La precipitación ocurre solamente después de su salida del dializador, debido a que la mayor parte de la precipitación está suficientemente retrasada en cuanto a tiempo.

Otro método para evitar la precipitación y obturación dentro del aparato es por la inversión periódica de la polaridad de la corriente.

Debido a los requerimientos de numerosas recirculaciones del plasma a través del aparato antes de la obtención de la desalación total, el procedimiento es esencialmente un proceso de cocura. No obstante, puede convertirse a semi-continuo por una operación secuenciada según el cual un recipiente intermedio recibe una porción de la solución total de proteína, dicha porción siendo desalada posteriormente en su totalidad por repetida recirculación a través del electrodiálizador, y después reemplazado por una nueva porción, como es bien conocido en la ciencia de automatización de procesos. Secuenciando el paso de la solución de proteína a través de sucesivas cáma-



ras de diálisis, se reduce el contenido de sal en cada cámara sucesiva hasta llegar a la cámara final donde el contenido en sal está a un mínimo.

5 La necesidad de potencia para la electrodiálisis no es crítica. La mayor parte de los experimentos han sido comenza-
dos con una densidad de corriente de aproximadamente 0,03 amps
/cm², requiriendo menos de 25 voltios/cm. Según la resisten-
cia del electrodiálizador disminuye progresivamente, debido al
10 incremento en resistencia de la solución de proteína, el volta-
ge se incrementa gradualmente hasta 100 voltios/cm. La densi-
dad de corriente final es baja, normalmente menos de aproxima-
damente 0,03 amps/cm². La limitación principal de la potencia
es que causa el calentamiento de la solución. El control de
la entrada total de potencia se basa en la comprobación de la
15 temperatura de las corrientes efluentes. Se puede mantener la
temperatura por debajo de cualquier valor deseado, de consonan-
cia con la estabilidad y manejo sanitario de las soluciones de
proteína, por ejemplo, la temperatura puede mantenerse por de-
bajo de 5 ó 10°C durante todo el experimento.

20 La higienización es de máxima importancia en el fracciona-
do de proteína. El aparato completo de electrodiálisis, to-
das las conexiones, tubos, bombas, etc., se higienizan in situ
por procedimientos convencionales, tal como aclarado con hidró-
xido de sodio diluido, ácido clorhídrico, hipoclorito u otros
25 agentes apropiados. Se prefiere el aclarado con hidróxido de
sodio ya que también es un medio efectivo de extraer proteínas
precipitadas.

B - Ambos, electroforesis de flujo forzado y electrodecana-
tación, han sido utilizados para el fraccionamiento de proteínas
30 de plasma según ilustran las patentes USA 2.801.962, 2.878.178



y 3.079,318. El objetivo normal ha sido el aislamiento de gamma globulina. La razon de este enfoque sobre la gama globulina es que estos procedimientos son facil y directamente aplicables debido a que la gama globulina es isoelectrica o casi isoelectrica a traves de una gama relativamente amplia de pH en torno a la neutralidad. Los dos procedimientos arriba detallados se diferencian principalmente solo en cuanto a componentes isoelectricos y móviles. En ambos procedimientos, los componentes móviles se llevan a la electrodecantacion, u el sobrenatante esta compuesto principalmente de componentes isoelectricos o casi isoelectricos, que (por definicion de la palabra "isoelectrico" - teniendo iguales cargas positivas y negativas es decir, teniendo una carga neta de cero) no se ven afectados por la aplicacion del campo electrico. La fraccion de decantacion contiene la mayor parte de la albúmina, que es el componente principal, mas mobil electroforéticamente, del plasma. No obstante, la albúmina fraccionada de este modo esta contaminada en alto grado por globulinas de movilidad intermedia, ampliamente referidas como alfa- y beta-globulinas.

Estos procedimientos de electroforesis de flujo forzado o electrodecantacion todavia no han encontrado aplicacion para la produccion comercial de gama globulinas o cualquier otra fraccion de plasma. Las razones para esto son numerosas, entre las cuales estan las siguientes:

1. No existe dificultad en el suministro de gama globulina. Se requiere mas albúmina que gama globulinas.

2. El método de fraccionado por alcohol Cohl proporciona un producto libre de agentes de hepatitis infecciosos. Todavia no es seguro si otros procedimientos, tal como los procedimientos eléctricos arriba mencionados, proporcionarian con-



tinuamente un producto igualmente seguro. Por consiguiente, muchos requerimientos legales requieren el proceso de fraccionado por alcohol. A la vista de la abundancia de este producto, existen pocos incentivos para cambiar el proceso.

5 De igual importancia son, no obstante, algunos fallos puramente técnicos de estos dos procedimientos eléctricos, que son solucionados por la presente invención:

1. Plasma contiene un número de proteínas relativamente inestables, que se precipitan fácilmente, bien como resultado de una baja solubilidad inherente o debido a desnaturalización. Por consiguiente, cuando se utiliza plasma, la longevidad de los conjuntos multi-membranas, utilizadas en estos dos procedimientos, esta limitada debido a que las membranas se ensucian como resultado de la precipitación. Debido a que el ensamblaje de estos aparatos multi-membrana es un elemento importante de coste, este hecho hace que el procedimiento sea costoso. Con la práctica de esta invención este problema queda eliminado totalmente por cualquiera de los dos tratamientos detallados en secciones anteriores: (a) fraccionado previo con alcohol resultando en el sobrenatante de la fracción Cohn II + III, ó (b) la desalación electrodiálítica. Cualquiera de estas dos etapas iniciales de fraccionado elimina las proteínas inestables, y no se observan membranas ensuciándose.

2. Aunque las membranas utilizadas en estos dos procedimientos de electroforesis y electrodecantación son esencialmente neutras eléctricamente, su carácter se ve alterado como resultado de la polarización de proteína a lo largo de las membranas, causada por el campo eléctrico, según se observa y explica en la patente USA no. 3.677.923. De este modo, un elemento de electrodiálisis se sobrepone al proceso de fracciona-



do, y ocurre una desalacion parcial de la fraccion "isoelectri
ca" que causa la precipitacion prematura. Por consiguiente,
las euglobulinas tienden a precipitar, y contribuyen al proble
ma mencionado anteriormente del ensuciamiento de la membrana.

5 Obviamente, se evita este problema en la presente invencion ya
que se han eliminado todas las euglobulinas en la desalacion
electrodialitica.

3. Plasma es altamente salino, correspondiendo a aproxi-
madamente 0,9% de cloruro sódico. Esto limita severamente el
10 campo eléctrico aplicable debido a que el calentamiento Joule
causado por el campo eléctrico es proporcional a la conductivi-
dad, es decir, contenido de sal, del fluido procesado. Como
resultado, las relaciones de procesado son bajas (siendo nueva-
mente proporcional al campo aplicado), y, como mucho, marginal
15 desde un punto de vista comercial. Se ha abogado por la diso-
lucion para remediar el contenido elevado de sal en la patente
USA no. 2.878.178, Ejemplo 3, pero esto es, como mucho, un e-
fecto paliativo, e incrementa los volúmenes a procesar comensu-
radamente.

20 Este problema se elimina totalmente en la presente inven-
cion. El efluente de la desalacion electrodialitica no tiene
sales residuales - y por consiguiente se evita el calentamien-
to excesivo como resultado del campo eléctrico. El calenta-
miento es perjudicial, por supuesto, debido consideraciones pu-
25 ramente sanitarias asi como por causar degradacion química.
Pueden aplicarse campos eléctricos superiores por el procedi-
miento de la presente invencion, resultando en relaciones de
produccion mas rápidas, haciendo el procedimiento economicamen-
te mas atractivo.

30 4. La mayor parte del contenido de sal en plasma es real



mente cloruro sódico, que no tiene ninguna acción amortiguadora en la gama de valores de pH a los que se efectúa el fraccionado de proteína. Así, el pH del fluido procesado no se controla bien con la resultante incertidumbre referente a la agudeza real del fraccionado, debido a que la movilidad electroforética de proteínas son altamente dependientes del valor de pH. La adición de amortiguadores apropiados a plasma no tratado puede disminuir la situación, pero también añade a la conductividad global de la solución, el cual, según se detalla anteriormente, es altamente indeseable. La previa desalación del líquido a procesar permite la adición apropiada de cualquier número de amortiguadores, tal como fosfato, tri(hidroximetil)aminometano, glicina, y similares, que ejercen su acción amortiguadora máxima en la gama de valores pH deseada, mientras que mantienen la conductividad del medio a un orden de magnitud inferior al del plasma no tratado. A este fin, los particularmente apropiados y preferidos son sales amortiguadoras anfotéricas, por ejemplo glicina, la que mientras que estabiliza el pH, no contribuyen significativamente a la conductividad del medio. Otras sustancias anfotéricas son los varios aminoácidos, incluyendo alanina, ó di- ó tri-peptidas, incluyendo glicilglicina y glicil-glicil-glicina. Tales productos son fácilmente obtenibles en el comercio, y proporcionan una gama apropiada de puntos isoeléctricos.

5. Investigadores anteriores no han podido utilizar técnicas tales como electroforesis de flujo forzado o electrode-cantación para la producción de cualquier fracción de plasma a excepción de gama globulina. Albúmina, en particular, fue imposible de preparar con pureza suficiente para su uso como expansor de plasma, por cualquiera de los investigadores ante-



5 riores. Esto ha sido remediado en la presente invencion, como resultado de: (a) eliminar el precipitado de las etapas de fraccionado Cohn II y III; (b) precipitar euglobulinas o materiales tipo euglobulinas por desalacion electrodiálitica; (c) mejores condiciones reinantes durante el fraccionado como resultado del contenido inferior de sal e introduccion de amortiguador apropiado en el líquido procesado, según se explica en los puntos 3 y 4 anteriormente; y (d) finalmente, permitir la utilizacion de condiciones especiales durante el fraccionado propiamente dicho.

10 Estas condiciones especiales (d) merecen un trato mas detallado:

15 Tanto en la electrodecantacion como en la electroforesis de flujo forzado, la corriente efluente se divide en dos fracciones. Se segregan los componentes mas móviles en la fraccion decantada, en el fondo de los compartimentos definidos por las membranas. Estos contienen la fraccion de albúmina deseada. Los componentes menos móviles o isoelectrónicos se segregan en la parte superior de los compartimentos definidos por las membranas. La distribucion relativa de los componentes en los 2 efluentes, a los que se denominaran en adelante, con el fin de simplificar, como los efluentes superior e inferior, es una función de muchos factores, incluyendo el campo aplicado, conductividad, temperatura, concentraciones relativas y la movilidad de cada componente de la mezcla.

25 Como norma, a máximo flujo constante, cuanto mas lento el flujo inferior mas alto sera su contenido en proteina. Ahora se ha descubierto que paralelamente a este incremento en concentracion de proteina, tambien existe un incremento en pureza de la fraccion de albúmina, recuperada en el efluente inferior

30



Para la concentración óptima de proteína, es necesario mantener el efluente inferior a una concentración de entre 15 y 25% del contenido total de proteína. Esto se consigue preferentemente manteniendo las relaciones de flujo superior a inferior a una relación entre 8:1 y 15:1, dependiendo de la concentración del abastecimiento de partida.

Electroforesis de flujo forzado y electrodecantación, según la presente invención, han sido efectuados utilizando los componentes de equipo según se describe en la patente USA no. 3.079.318. Se han utilizado tres diferentes modos de operación con éxito. Estos se ilustran esquemáticamente en las figuras que son representaciones esquemáticas de las vistas laterales de las membranas y filtros utilizados en este tipo de aparatos. Los números no detallan los espaciadores que mantienen los componentes en su sitio apropiado, que pueden incluir los medios de entrada y salida. Las líneas sólidas representan membranas que son del tipo utilizado generalmente en diálisis pasiva, es decir, membranas eléctricamente neutras, tal como celulosa regenerada vendida bajo el nombre comercial "Visking" por la empresa Union Carbide. La línea discontinua representa los filtros. Estos pueden ser de muchos diferentes tipos, incluyendo filtro de papel (por ejemplo Whatman No. 54), filtros microporosos según comercializa la firma Millipore ó la Gelma Corp., o ciertos tipos de elementos separadores de acumuladores tal como los utilizados por la Mallory Corp.

La diferencia esencial entre filtros y membranas, descrita anteriormente, es que los filtros son permeables a las proteínas y permiten el flujo de líquido basto a través de los mismos. Las membranas, por otro lado, retienen proteínas y no permiten el flujo de líquido basto a través de los mismos, pe-



ro unicamente una ultrafiltracion lenta. Las flechas en las figuras indican la direccion del flujo de los líquidos a traves del aparato.

La Figura 1 ilustra el modo de electrodecantacion, mientras que las Figuras 2 y 3 ilustran dos modalidades de electroforesis de flujo forzado, diferenciandose en el emplazamiento de la entrada de abastecimiento. Estas dos modalidades se diferencian poco en cuanto a sus resultados y pueden ser utilizados uno por otro.

Las Figuras tambien ilustran la diferencia esencial entre la electrodecantacion y la electroforesis de flujo forzado. En la electroforesis de flujo forzado, los filtros separan cada compartimento electroforético en dos subcompartimentos. Los filtros actuan esencialmente como límites de friccion entre porciones de flujo ascendente y descendente de líquido, y así añaden sustancialmente a la eficacia del procedimiento. Aunque, por consiguiente, la electroforesis de flujo forzado es la técnica preferida, resultados esencialmente similares se consiguen por la electrodecantacion.

Un elemento deseado en el procedimiento, aunque no esencial, es la separacion de compartimentos electroforéticos individuales entre sí por canalizaciones para el flujo de electrolito apropiado. El electrolito proporciona principalmente un máximo enfriamiento interno del aparato, y a este fin, se circula el electrolito a traves de un intercambiador de calor de refrigeracion externa.

Se prefiere que este electrolito sea un amortiguador, y que las mismas consideraciones son aplicables a este según se describe anteriormente respecto a la amortiguacion de la solución de proteina que se esta procesando. Así, pueden utilizarse



fosfato, glicina, octanoato sódico u otros amortiguadores. La conductividad eléctrica del amortiguador debe ser del mismo orden que la conductividad de la solución de proteína que se procesa para asegurar un campo eléctrico relativamente uniforme por todo el aparato. Este amortiguador también juega una parte adicional importante en el fraccionamiento de soluciones de proteína que contienen alcohol. Por su difusión a través de las membranas, se puede eliminar una parte sustancial del alcohol de las soluciones de proteína efluentes, donde sea indeseado.

10

EJEMPLO I

15

20

25

Este Ejemplo demuestra la diferencia entre euglobulinas y materiales tipo euglobulinas, es decir, la diferencia entre la precipitación de proteínas desaladas en ausencia o presencia de alcohol al 10%. Se desalaron 2 litros de plasma bovina en una célula de electrodiálisis consistente en dos pares de membranas catiónica y aniónica, de 22,86 x 25,4 cm, hasta haber alcanzado la resistencia eléctrica específica de 200.000 ohms-cm, a un pH de 5,2. Se obtuvo un precipitado voluminoso, que fue centrifugado a 0°C. El análisis del sobrenatante mostró la presencia de albúmina de 84%, con todavía unos 4% de gama globulinas. La adición a 0°C de 10% de alcohol por volumen al sobrenatante resultó en una segunda precipitación, que nuevamente fue centrifugado a la misma temperatura. El sobrenatante resultante se analizó y mostró 95% de albúmina, y menos de 0,5% de gama globulina.

30

EJEMPLO II

Este Ejemplo demuestra la recuperación, por desalación, de una fracción enriquecida de albúmina de la fracción sobrenatante denominada Cohn II + III, obtenida por precipitación de plasma con alcohol al 18%. También demuestra la ventaja de la



redisolucion selectiva de parte de la albúmina, precipitada con la fraccion tipo euglobulina, y el efecto de resistencia eléctrica y pH sobre la pureza así obtenida. 2 litros de sobrenatante Cohn II + III fueron desalados según el Experimento I, y separados en porciones de 100 ml. Cada porcion fue procesado independientemente, manteniendo todos los líquidos a 0°C durante todo el proceso, incluso durante la centrifugacion.

Despues del desalado minucioso, la resistencia de la solucion de proteina fue de 240.000 ohms-cm, pH de 5,2. En algunas muestras, la resistencia disminuyo por la adicion de cloruro sódico concentrado, que tuvo un efecto despreciable sobre el pH. En dos muestras se elevó el pH por adicion de hidróxido sódico. Esto tambien resulto en una significativa disminucion de la resistencia. Despues de estos ajustes, todas las porciones de muestra fueron centrifugadas, decantadas y el precipitado lavado en la mitad del volumen original de bien agua destilada, o una solucion alcohólica de concentracion indicada. Se volvio a suspender el precipitado en este lavado, y la suspension resultante nuevamente centrifugada. El sobrenatante es la "albúmina recuperable", mientras que el residuo es el precipitado. Los datos de la Tabla I muestran el contenido resultante en albúmina de todas las fracciones:

TABLA I

Se puede apreciar facilmente que la pureza de la albúmina recuperada esta influenciada fuertemente por el contenido en alcohol del medio de suspension. Mientras que los precipitados podrian todavia tener un contenido relativamente alto de albúmina, la pérdida de albúmina, considerando el pequeño peso del precipitado es inferior al 8% de la albúmina total, siendo la recuperacion superior al 90% en todos los casos.



TABLA I.

Efecto de pH, resistencia y contenido alcohólico en la pureza de fracciones de proteína.

Muestra Número	Resistencia	pH	Sobrena-	Lavado	Recupe-	Precipi-
	Específica (ohms-cm)		tante		racion	tado
			%-Alb.	%-Alcohol	%-Alb.	%-Alb.
5	240.000	5,2	95,5	15	93,1	70,5
	240.000	5,2	95,3	10	95,9	62,5
	240.000	5,2	95,8	5	91,0	35,0
10	240.000	5,2	97,0	0	85,2	37,4
	100.000	5,3	94,6	0	81,4	35,4
	45.000	5,3	96,0	0	83,5	33,4
	21.000	5,3	92,8	0	79,5	27,5
	10.000	5,3	92,1	0	71,2	2,5
15	6.300	5,3	96,2	0	62,4	9,2
	58.000	5,4	94,9	0	74,6	3,1
	30.000	5,7	91,2	0	60,2	3,2

EJEMPLO III

Este Ejemplo ilustra el efecto de la temperatura durante la separación del precipitado tipo euglobulina del plasma que contiene alcohol. El material de partida fue el mismo que el del Experimento II, es decir, sobrenatante Cohn II + III minuciosamente desalado. Esto fue dividido en porciones de 100 ml, y centrifugados a las temperaturas indicadas (vease Tabla II).

Todos los precipitados fueron suspendidos nuevamente en un volumen igual de alcohol al 10% en agua destilada, y centrifugados una segunda vez. Esta etapa de lavado fue repetida una segunda vez, proporcionando una fracción segunda de albúmina recuperable y el precipitado final. Todas las etapas fueron efectuadas bajo control estricto de temperatura, según se indi-



ca; los datos se proporcionan en la Tabla II.

TABLA II

Muestra	% - Albúmina a temperatura indicada			
	(0°C)	(5°C)	(10°C)	(15°C)
5 Primer Sobrenatante	97,7	94,0	91,8	85,5
Primera Recuperacion	94,1	91,2	90,1	85,5
Segunda Recuperacion	89,2	82,3	78,1	78,0
Precipitado	17,5	10,2	5,5	5,0

EJEMPLO IV

10 Este Ejemplo ilustra la aplicacion del procedimiento de la invencion para la preparacion de un concentrado de albúmina, utilizando las etapas de desalado de una fraccion de proteina de plasma que contiene alcohol, separacion de un precipitado de proteina tipo euglobulina, recuperacion de una albúmina par-

15 cialmente precipitada por un proceso de lavado en alcohol al 10%, y, finalmente, concentracion, y purificacion adicional utilizando electroforesis de flujo forzado de los sobrenatantes combinados procedentes de la primera precipitacion tipo euglobulina y la proteina recuperada.

20 El material de partida fueron 10 litros del asi llamado sobrenatante de la Fraccion Cohn IV-1, que es una etapa posterior intermedia en el presente esquema de fraccionado por alcohol. El material de partida fue primeramente desalado como en el Ejemplo I, utilizando un conjunto de célula de cinco pa-

25 res de membranas. La fraccion precipitada, tipo euglobulina, fue centrifugada y lavada dos veces con porciones de 1 litro de una solucion al 10% de alcohol en agua destilada. Los sobrenatantes de esta etapa de recuperacion de albúmina fueron combinados con el sobrenatante de la primera centrifugacion.

30 Los sobrenatantes combinados fueron ajustados a un pH de 7,5



utilizando hidróxido de sodio y concentrado por electroforesis de flujo forzado, con un conjunto de 5 células del tipo ilustrado en la Figura 2, proporcionando un concentrado de fondo de albúmina y una fracción de efluente superior. Los resultados del fraccionado se detallan en la Tabla III.

Tabla III

El concentrado de albúmina solo tiene un contenido en alcohol del 5%, mientras que la alimentación original, concretamente la Fracción Cohn IV-1 tenía un contenido en alcohol del 40%. Así, la concentración por flujo forzado resultó en una disminución significativa en el contenido de alcohol debido a la diálisis. El desalado no altera el contenido en alcohol.

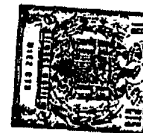
Preparación de concentrado de albúmina a partir de Fracción Cohn IV-1.

TABLA III

Muestra	Volu men (L)	Concent. Proteinas (gms/L)	% Albúmina	Proteína Total (gm)	Albúmina Total (gm)	% Rendimiento de Albúmina
Aliment.	10	23,2	90,6	232	210	--
Albúmina	1,25	167,5	96,5	209,4	200,8	95,7
Preci'do.	0,4	54,6	40,3	21,9	8,8	4,2
Efluente	12	0,3	40,0	3,6	1,4	0,7

EJEMPLO V

Este experimento ilustra la nueva metodología utilizada para recuperar fracciones valiosas de materiales actualmente rechazados. El material de partida fueron 2.000 gm de precipitado húmedo del así denomina paso IV-4 del esquema de fraccionado por alcohol Cohn. Este material contiene principalmente muchas alfa y beta globulinas, pero también contiene entre 40 y 50% de albúmina, que actualmente se desperdicia. Este preci



pitado fue suspendido en 10 litros de agua, y minuciosamente
 desalada según el Ejemplo I. Entonces se añadió 1 litro de al-
 cohol, manteniendo la solución a 0°C. Esto resultó en la for-
 mación de un precipitado copioso. Se aclaró el sobrenatante
 5 por centrifugación, y se encontró que contenía 1,6% de albúmi-
 na, a una pureza de 90,5%. Un total de 180 gm de albúmina fue-
 ron recuperados de los 2.000 gm de pasta, que tenía un conteni-
 do total de albúmina de aproximadamente 320 gm. Por consiguie-
 te, más del 50% de la albúmina normalmente desperdiciada fue
 10 recuperada.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así
 como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse cons-
 tar que las disposiciones anteriormente indicadas son suscepti-
 15 bles de modificación de detalle en cuanto no alteren su princi-
 pio fundamental. También se hace constar que el invento se re-
 fiere a una Solicitud de Patente Norteamericana, no. 467.115,
 presentada el 6 de Mayo de 1.974, acogiendo por lo tanto a
 los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en
 20 vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido inven-
 to y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años
 en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA EL FRACCIONADO DE SOLU-
 CIONES LIQUIDAS DE MEZCLAS DE PROTEINA; caracterizándose por
 lo siguiente:

25 1. Procedimiento para el fraccionado de soluciones líquidas
 de mezclas de proteína, seleccionadas del grupo consisten-
 te en plasma, suero, y fracciones derivadas de estos, caracte-
 rizado porque comprende las etapas de: (a) someter dichas so-
 luciones a electrodiálisis en la gama de pH entre 4,8 y 6; (b)
 30 efectuar dicha electrodiálisis a temperaturas inferiores a los

30



15°C; (c) continuar dicha electrodiálisis hasta que la resistencia específica de la mezcla resultante exceda los 1000 ohm-cm y precipita una fracción de dicha mezcla de proteína; (d) separar el precipitado de la solución de proteína soluble sobrenatante; y (e) recuperar dicha solución de proteína soluble sobrenatante.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la resistencia específica de la mezcla resultante, al completarse la electrodiálisis, está en la gama de 50.000 - 200.000 ohm-cm y se mantiene la temperatura por debajo de aproximadamente 5°C.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la electrodiálisis de desalado se efectúa hasta que el pH final de $5,3 \pm 0,2$ se alcanza, siendo este el punto isoelectrónico de proteínas de euglobulina y/o de tipos de euglobulina.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la fracción precipitada separada en la etapa (d) es la euglobulina y/o de tipo euglobulina en plasma.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la mezcla de proteína derivada del plasma es una fracción que contiene albúmina, obtenida por el fraccionado de plasma por el proceso de alcohol Cohn, tal como la fracción sobrenatante Cohn II y III, dicha fracción conteniendo como mínimo 20% de alcohol, según el cual la fracción de euglobulina y tipo de euglobulina que se hizo precipitar por el proceso de electrodiálisis y se separó en la etapa (d) incluye alfa- y beta-globulinas, principalmente, con lo que se consigue una mayor pureza de albúmina en la fracción de proteína soluble recuperada.



6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la solución de proteína soluble, sobrenatante, desalada, de la etapa (e), se trata con alcohol para precipitar sus proteínas, consistentes principalmente en albúmina.

5 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 5, caracterizado porque la solución o suspensión electrodiálizada se ajusta a un contenido en alcohol de 10 - 20%, dicho contenido de alcohol en plasma, o soluciones o suspensiones derivadas de plasma, electrodiálizadas causan el óptimo fraccionamiento de proteínas de euglobulinas o de tipos de euglobulinas de proteínas solubles sobrenatantes, y dan el resultado de una mayor pureza de albúmina en la fracción sobrenatante y en la separación y recuperación de dicha fracción sobrenatante.

10 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 ó 7, caracterizado porque la euglobulina, o material de tipo euglobulina, recuperada se redisuelve parcialmente en una solución que contiene alcohol al 5 - 15%, y se combina la solución de proteína sobrenatante que resulta con la fracción de proteína sobrenatante que resulta con la fracción de proteína soluble que contiene albúmina.

15 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 5, caracterizado porque la solución de proteína soluble sobrenatante, recuperada de la etapa (e), se trata adicionalmente por amortiguación en la gama de pH de máxima movilidad electroforética de proteína y a continuación se trata en una etapa de separación por campo eléctrico.

20 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la etapa de separación por campo eléctrico es una electrodecantación.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la etapa de separación por campo eléctrico es una etapa de electroforesis de flujo forzado.

5 12. Procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 ó 5, caracterizado porque la fracción precipitada separada en la etapa (d) se redissuelve por adición de una solución alcalina para elevar el pH a aproximadamente 6, y electrodiálisis la fracción precipitada redissuelta nuevamente.

10 13. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la solución de proteína soluble sobrenatante, recuperada en la etapa (e), es anfótero, y se trata con amortiguadores anfóteros con elevada capacidad de amortiguación y que contribuyen poco para incrementar la conductividad eléctrica específica de la solución.

15 14. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 13, caracterizado porque dicho amortiguador anfótero se selecciona del grupo consistente en tri(hidroximetil)aminometano, glicina, alanina, glicil-glicina, diglicil-glicina.

20 15. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho producto amortiguador de la etapa de diálisis se divide durante dicho proceso de separación por campo eléctrico en efluentes superior e inferior, como resultado de dicho proceso de separación y la relación de flujo de dichos efluentes superior e inferior se mantiene en una relación entre
25 8:1 y 15:1.

16.- Procedimiento para el fraccionado de soluciones líquidas de mezclas de proteína, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria y en los dibujos adjuntos.

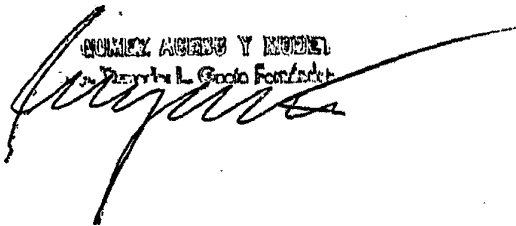
5

Esta Memoria consta de 33 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 15 DIC. 1976

HAROLD STERN

DOMINGO AGUIRRE Y REBOL
Calle de L. García Fontán, 11





15

FIG. 1

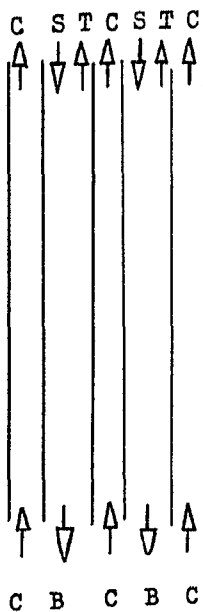


FIG. 2

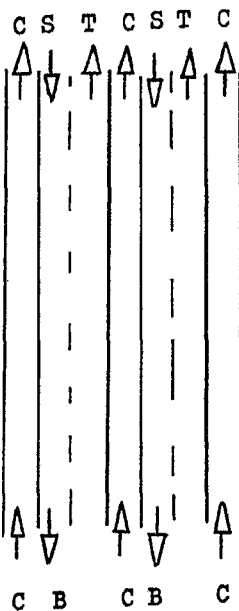
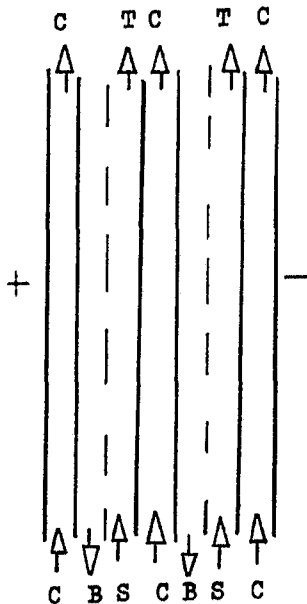


FIG. 3



ESCALA VARIABLE

28 OCT. 1975

Madrid

L. GOMEZ ACEBO Y MUÑOZ
C/Alfonso de Euzkadi, 1, Casja Fernández