

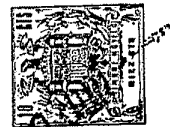
Int. Cl. C07G

1439397

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a una PATENTE DE INVENCION por "Procedimiento para la obtención de inmunoglobulina humana con alta proporción de inmunoglobulina A", a favor de Laboratorios Hubber, S.A., entidad española, domiciliada en Barcelona, Berlín, 38.

* * *
*



Conforme se indica en el enunciado, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la obtención de inmunoglobulina humana con alta proporción de inmunoglobulina A.

La inmunoglobulina A es conocida también como γ A inmunoglobulina, γ 1_A globulina, β 2_A globulina, β x globulina.

Las inmunoglobulinas humanas son proteínas del plasma humano, siendo muy importantes sus propiedades como anticuerpos, y se encuentran en el plasma humano y en diversa proporción son las llamadas IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Diversas investigaciones, promovidas especialmente por el Dr. Schwick en Alemania y la Dra. Steinbuch en Francia (1967), demostraron que los anticuerpos contenidos en la IgA, IgM, IgD, IgE difieren cualitativa y cuantitativamente de los contenidos en la IgG. Estas demostraciones han quedado confirmadas posteriormente.

Las preparaciones a base de inmunoglobulinas existentes en el mercado farmacéutico, son del tipo IgG, y una baja proporción de IgA, IgM (1 - 2%).

Para el aislamiento de IgA del plasma humano, se han seguido diferentes caminos basados en la solubilidad de inmunoglobulinas en presencia de iones metálicos, electroforesis preparativa, cromatografía sobre resina, diversas precipitaciones con sulfato amónico, rivanol, polietilenglicol, o diferentes ácidos orgánicos, adsorción sobre Al_2O_3 , inmunoadsorción, etc., y generalmente combinando varios de los anteriormente expuestos.

La mayor parte de estos métodos son de una elevada complejidad de material, instrumental y con un largo proceso de preparación en muchos pasos, por lo que casi sólo se usan para fines analíticos.

La dificultad de preparar inmunoglobulinas enriquecidas en IgA estriba principalmente en dos factores:

1º. Como en toda separación, ésta es tanto más posible cuanto más diferentes son las propiedades físico-químicas de las sustancias a separar. En el caso de la IgA, en el plasma hay otras muchas proteínas que tienen propiedades físico-químicas parecidas.

3.



2ª. a) La proporción de IgA en el plasma es baja, lo que conduce a tener que trabajar con grandes cantidades de plasma o usar concentrados cuando se desea obtener determinadas cantidades. b) La Proporción de IgA respecto al resto de otras proteínas plasmáticas es igualmente baja; de las 40 proteínas más conocidas existentes en el plasma, 12 lo están en mayor o igual proporción que la IgA, lo que dificulta la preparación de un producto libre de otras impurezas.

La principal ventaja del procedimiento según la actual invención, es su relativa sencillez en material, instrumental y número de pasos con el fin de poder ser procesado industrialmente, lo cual implica una regulación precisa de cada una de las variables que intervienen.

Como materia prima se usa Fracción III, obtenida del plasma por el método de Cohn. Partiendo de 9 kilos de esta Fracción, seguidamente se ofrece un ejemplo concreto, con finalidad y alcance puramente ilustrativos.

Fase: Extracción.

Se descongelan y pesan 9 kgs de Fracción III. Se le añade parte del agua destilada de un total de 100 litros, y pastando con un triturador, agitando a gran velocidad; luego se añade el resto del agua y se continúa agitando hasta conseguir homogeneidad, durante una/dos horas, y obteniéndose un pH final de $4,8 \pm 0,2$. Se regula el pH añadiendo NaOH 1N hasta conseguir un pH de 5,8. Llevando la suspensión a una temperatura entre 4°C y 6°C , agitando enérgicamente, pero evitando que se forme espuma, durante 24 horas y a dicha temperatura. Después se centrifuga la suspensión a 15.000 rpm con una centrífuga del tipo Sharples, a una temperatura entre 4°C y 6°C , y filtrando en el caso de que hubiera turbiedad.

Fase: Precipitación con ácido caprílico.

Se regula la temperatura llevando el sobrenadante de la fase anterior a temperatura entre 18°C y 22°C . Seguidamente se regula la fuerza



- iónica, añadiendo acetato sódico sólido al sobrenadante anterior, hasta conseguir una fuerza iónica $I = 0,030/0,035$, y resultando un pH aproximado de $6,2 \pm 0,1$. Se regula este pH añadiendo ácido acético 1M hasta conseguir un pH de 4,8. Luego se le añade el ácido caprílico, haciéndolo lentamente y agitando vigorosamente, en la proporción de 7 a 10 gramos de ácido caprílico por litro de sobrenadante, manteniendo la temperatura de $18/22^{\circ}$, y agitando durante treinta minutos después de la adición, para luego dejar reposar durante unas dos horas. La mezcla obtenida se refrigera hasta temperatura de 6°C a 10°C , agitando muy suavemente, para después centrifugar a 15.000 rpm en centrífuga tipo Sharples y a la misma temperatura de $6/10^{\circ}\text{C}$, filtrando en el caso de que quede turbio.

Fase: Precipitación con alcohol.

- Al sobrenadante anterior se le añade NaOH 1M hasta conseguir un pH entre 5,7 y 5,9 llevándolo a temperatura entre 0°C y 2°C , y agitando. Se empieza a añadir etanol, y se continúa refrigerando con una relación lineal de volumen añadido/temperatura, y hasta una temperatura final de -7°C , con de 27 a 32% de etanol. Según el tipo de centrifugación a realizar, se puede dejar decantar durante 5 a 8 días a -8°C , separando el sobrenadante, centrifugando la mezcla a 15.000 rpm a una temperatura entre 7°C y 9°C , y recogiendo el precipitado.

Fase: Disolución.

- Al precipitado de la operación anterior, se le añade agua destilada para que la concentración final sea, aproximadamente, entre 2,5 y 3,5 gramos de proteína por 100 ml de disolución. Se le añade glicocola suficiente para que la preparación sea, aproximadamente, de 12 a 18 gramos de glicocola por 100 gramos de proteína, agitando cuidadosamente para que no se forme espuma, y distribuyendo el resultado en bandejas.

En la siguiente y última fase, el producto se liofiliza.

- Como resultado de este procedimiento, se puede conseguir un liofilizado en el que por lo menos el 90% (p/p) de las proteínas son inmu-

5.



noglobulinas, y con una riqueza en IgA de 43 a 53 por ciento sobre proteínas totales.

Sin perjuicio de lo expuesto, el actual procedimiento será variable en todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique su esencialidad, que es la que se concreta en la reivindicación que sigue.

N O T A.

Se declara de novedad y propiedad, para España y sus territorios, las siguientes

REIVINDICACIONES.

10. 1. Procedimiento para la obtención de inmunoglobulina humana con alta proporción de inmunoglobulina A, caracterizado por el hecho de partir de una cantidad de Fracción III obtenida por el método de Cohn, a la cual se añade parte de agua destilada sobre un total aproximadamente once veces superior en el peso de dicha cantidad, y pastando con un triturador, agitando a gran velocidad, para luego añadir el resto del agua y continuar agitando hasta conseguir homogeneidad, alcanzándose un pH final de $4,8 \pm 0,2$ el cual pH es rectificado hasta 5,8 mediante adición de NaOH 1N, llevando la suspensión a una temperatura entre 4°C y 6°C , agitando enérgicamente, evitando que se forme espuma, durante unas 24 horas, manteniéndose la temperatura, para luego centrifugarse a 15.000 r.p.m., preferiblemente con centrifuga tipo Sharples, a la misma temperatura, filtrando en el caso de que resultara turbiedad, y aumentándose después la temperatura hasta entre 18°C a 22°C , regulándose la fuerza iónica mediante adición de acetato sódico sólido, hasta alcanzar $I = 0,030 / 0,035$, con un pH aproximado de $6,2 \pm 0,1$ que se regula añadiendo ácido acético 1M hasta situarlo en 4,8, para luego adicionarle ácido caprílico, haciéndolo lentamente y agitando vigorosamente, en la proporción de 7 a 10 gramos por litro de sobrenadante, manteniendo la temperatura de 18°C a 22°C , agitando durante unos treinta minutos después de la adición, siguiendo un reposo de unas dos horas, y refrigerándose la mezcla hasta de 6°C a 10°C , agitando muy suavemente,

100
30.

6.



para después centrifugar a 15.000 r.p.m. asimismo en centrifuga tipo Sharples y a la misma temperatura de 6°C/10°C, filtrando en el caso de que quede turbio, y obteniéndose un sobrenadante al que se le añade NaOH 1M hasta un pH entre 5,7 y 5,9 llevándolo a temperatura entre 0°C y 2°C agitando,

5. para después añadirle etanol hasta un 27 a 32 por ciento, siguiendo la refrigeración con una relación lineal de volumen añadido, con temperatura de -7°C centrifugándose la mezcla a 15.000 r.p.m. a una temperatura de -7°C a -9°C, y recogiendo el precipitado, al que se añade agua destilada hasta una concentración final entre 2,5 y 3,5 gramos de proteína por 100 ml. de disolución, adicionándole glicocola en una proporción de 12 a 18 gramos por cada 100 gramos de proteína, agitando cuidadosamente para evitar la formación de espuma, y distribuyéndose el resultado, que posteriormente se liofiliza.

15. 2. Procedimiento para la obtención de inmunoglobulina humana con alta proporción de inmunoglobulina A.

Todo ello, tal y como se reivindica y describe en la presente memoria, que consta de seis hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Barcelona a 30 de junio de 1975.

LABORATORIOS HUBBER, S. A.
Director General

