

Int. Cl.: C 07G; A 61K

Nº 443.982

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: RATIOPHARMA ANSTALT

RESIDENCIA: Städtle 22, VADUZ, Liechtenstein

10 NOV 1977

ENUNCIADO: " UN PROCEDIMIENTO PARA ELEVAR LA TOLE-
RANCIA INTRAVENOSA DE GLOBULINAS GAMMA
PRECIPITADAS DE LA SANGRE O DE PRODUCTOS
SANGUINEOS "

Prioridad: Patente alemana n.º P 25 00 076.4 del 2-1-1975

1 El invento se refiere a un procedimiento para mejorar la tolerancia intravenosa de globulinas gamma precipitadas de la sangre o de productos sanguíneos.

5 La sangre es un líquido que consiste en componentes sólidos y líquidos. Entre los componentes sólidos figuran los glóbulos rojos y los blancos, así como los trombocitos. El plasma o parte líquida de la sangre contiene aproximadamente 90 % de agua y 10 % de sólidos. Entre las sustancias disueltas en el plasma figura, entre otras, la globulina gamma, que se emplea para el tratamiento y la profilaxis de infecciones. Para aislar la globulina gamma es preciso eliminar a ser posible todas las demás sustancias existentes en el plasma, con objeto de disponer de una globulina gamma lo más pura posible.

15 Para precipitar y aislar la globulina gamma de la sangre, sirve en especial un procedimiento conocido por el nombre de "método COHN" (COHN et. al., J. Amer. Chem. Soc., volumen 68, págs. 459...475; Volumen 72, págs. 465...474). Este procedimiento parte de un plasma mezclado a base de diversas muestras de sangre. En principio se trata de una precipitación fraccionada en distintas condiciones. En la primera etapa, a menos 3° C y un valor pH de 7,2, y con una adición de etanol de 8%, se separa preponderantemente fibrinógeno como primer sedimento. El líquido excedente se precipita en una segunda etapa con aproximadamente 19 % de etanol y a un valor pH de 5,6. El sedimento contiene preponderantemente globulina gamma. Para purificar este sedimento, denominado fracción COHN II-III, se vuelve a disolver, y por lo pronto se reprecipita a un valor pH de 5 y con 8 % de etanol. El líquido restante se vuelve a precipitar entonces

20

25

30

1 con 25 % de etanol y a un valor pH de 7,2. El sedimento producido con ello consiste en al menos 90 % de globulina gamma. El sedimento se recibe en una solución tampón apropiada y, una vez efectuada una filtración esterilizada, está en disposición para su aplicación en personas.

5 Se ha comprobado que en muchos casos los preparados de globulina gamma obtenidos de la manera descrita anteriormente o de otro modo, son de efecto anticomplementario, de modo que al ser administrados por vía intravenosa se producen complicaciones por reacciones propias del organismo.

10 Se ha intentado ya por lo tanto elevar la tolerancia intravenosa de globulinas gamma. Como ejemplos pueden citarse los siguientes procedimientos conocidos por la bibliografía.

- 15
1. Tratamiento con enzimas apropiadas;
 2. Hidrólisis a alta concentración de iones de hidrógeno (por ejemplo, a un valor pH de 4,0);
 3. Modificación con betapropiolactona.

20 Ahora bien, se ha comprobado que los procedimientos conocidos modifican las moléculas de la globulina gamma, modificándola de tal modo en su estructura química, que se reduce su eficacia y se acorta su tiempo medio de permanencia en el organismo.

25 Se presenta por lo tanto el problema de indicar un nuevo procedimiento para elevar la tolerancia intravenosa de globulinas gamma, que por una parte evite los inconvenientes de los procedimientos conocidos y, por otra parte, ofrezca las mejoras siguientes:

- 30
- las moléculas existentes de globulina gamma han de ser modificadas lo menos posible en su estructura;

- 1 - la acción anticomplementaria debe reducirse fuertemen-
te con relación a los preparados conocidos de globuli-
na gamma;
- 5 - la permanencia en el organismo debe ser prolongada, y
al mismo tiempo debe ser el preparado más tolerable que
los conocidos.

Estos problemas se resuelven mediante un procedimiento
destinado a elevar la tolerancia intravenosa, en el que la
globulina gamma precipitada de la sangre o de otros produc-
10 tos sanguíneos se vuelve a disolver en presencia de sustan-
cias macromoleculares que protejan las moléculas de globuli-
na entre sí y las expulsen de la solución, tales como fécu-
la hidroxiletílica (HÁS), gelatinas, dextranos, albúmina,
polialcoholes o polivinilos, a continuación de lo cual se
15 hacen precipitar y se vuelven a recibir en especial en una
solución fisiológica de cloruro de sodio.

La eficacia de la HÁS representa un óptimo según los
conocimientos actuales; no obstante es posible también con-
seguir un efecto similar mediante la adición de las otras
20 sustancias citadas.

Preferentemente se vuelve a disolver el disolvente en
una solución acuosa tamponada de HÁS, que posea un valor pH
de 3,5 a 8,0. Como valor de trabajo especialmente favorable
ha resultado ser un valor pH de 6,5 a 6,9.

25 - El contenido de HÁS en la solución acuosa puede ascen-
der a entre 1 y 30 %; un valor de trabajo especialmente bue-
no resulta en 8 a 10% de HÁS.

Preferentemente se trabaja con una HÁS de un peso mole-
cular de entre 1000 y 900.000.

30 Después de volver a disolver el sedimento de globulina

1 gama en la solución tamponada de H₂AS, se le agrega a la mez-
cla 10 % de polietilenglicol. La mezcla contiene componen-
tes precipitados y sin precipitar. Estos últimos son preci-
5 pitados por el polietilenglicol, y a continuación se centri-
fugan. En lugar del polietilenglicol pueden emplearse como
agente precipitante también otros alcoholes polivalentes po-
limerizados. La mezcla se centrifuga. El sobrante residual
se mezcla en un valor pH de 7,0 a 7,2 con 20 % de polieti-
lenglicol, y se vuelve a centrifugar. El sedimento así ob-
10 tenido se disuelve convenientemente en una solución fisio-
lógica de cloruro de sodio, y se pone a una concentración
de aproximadamente 5 % de albúmina. Después de una filtra-
ción esterilizada, la solución está a disposición para su
aplicación terapéutica.

15 A continuación serán explicadas otra vez con más deta-
lle las diversas etapas del procedimiento a base de un
ejemplo.

Separación de la globulina gamma:

20 Se parte de un plasma recogido que se mezcla con 8 %
de etanol, y que se precipita a menos 3° C en un valor pH
de 7,2. Se separa con ello la fracción I. El líquido que
queda encima se mezcla a continuación, a menos 5° C y un
valor pH de 5,8, con 19 % de etanol. Se separa con ello la
fracción II-III, que consiste en globulinas gamma. El sedi-
25 mento se disuelve otra vez y, con un valor pH de 5, se pre-
cipita de nuevo con 8 % de etanol. Lo restante de encima se
precipita entonces nuevamente con 25 % de etanol y en un
valor pH de 7,2. El sedimento producido a este particular.
(= fracción II) consiste en al menos 90 % de globulina gamma.

30 Reducción de la acción anticomplementaria:

1 El sedimento de globulina gamma se vuelve a disolver
en una solución acuosa tamponada a un valor pH de 6,7 y en
una concentración de aproximadamente 6 %, habiéndose agrega-
do a la solución acuosa unos 10 % de fécula hidroxiletílica.
5 La HÁS hace posible una separación de agregados ya existen-
tes, y al mismo tiempo origina una protección de globulinas
gamma no agregadas.

Transformación en una solución fisiológica de cloruro de
sodio:

10 Después de agregar 10 % de polietilenglicol, se centri-
fuga la mezcla. La parte restante se mezcla a un valor pH de
7,2 con 20 % de polietilenglicol y se centrifuga. El sedi-
mento así obtenido se incorpora a una solución fisiológica
de cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración de
15 5,2 % de albúmina, y a continuación se filtra en forma esté-
ril. Con ello queda a disposición de ser aplicado terapéuti-
camente.

El ejemplo gráfico adjunto muestra en

20 la fig. 1, la fórmula estructural de la fécula hidroxil-
etílica (HÁS);

la fig. 2, Diagramas de inmuno-electroforesis (IEP) de
diversas globulinas gamma y respectivamente
sueros normales, obtenidos por procedimien-
tos conocidos y respectivamente nuevos. La
25 mitad superior del diagrama muestra a este
particular sendos diagramas IEP de sueros
sanguíneos normales, mientras que la mitad
inferior muestra diagramas de las sustancias
siguientes:

30 a) Globulina gamma standard;

1

b) globulina gamma modificada proteoliticamente;

c) globulina gamma modificada con betapropiolactona;

5

d) globulina gamma obtenida por el nuevo procedimiento.

10

En las muestras conforme a los diagramas a) a c) se trata en cada caso de un preparado modificado existente en el comercio. Estas muestras presentan además de la curva de la globulina gamma (curva alargada en forma de hoz en la zona derecha del diagrama), también otros componentes albuminosos de la sangre humana. Las curvas de globulina gamma aparecen en las muestras a) y b) poco nítidas, debido a la modificación química. La muestra c) presenta una posición variada con relación a la curva de globulina gamma del suero de comparación.

15

Frente a esto se aprecia claramente que la muestra d) consiste practicamente de manera exclusiva en globulina gamma pura, puesto que la curva de forma de hoz del espectro está contenida claramente en el suero normal.

20

De los diagramas se desprende que la globulina gamma obtenida por el nuevo procedimiento es practicamente pura al 100 %, correspondiéndose totalmente con la globulina gamma del suero sanguíneo original. Esto último significa que las moléculas no están modificadas ni variadas químicamente. A base de estas propiedades resultan también las otras ventajosas propiedades de la globulina gamma conforme al invento comprobadas en los ensayos, a saber, su absolutamente segura tolerancia intravenosa y su acción anticomplementaria fuertemente disminuida con relación a las sustancias de defensa propias del organismo, que han podido ser comprobadas

25

30

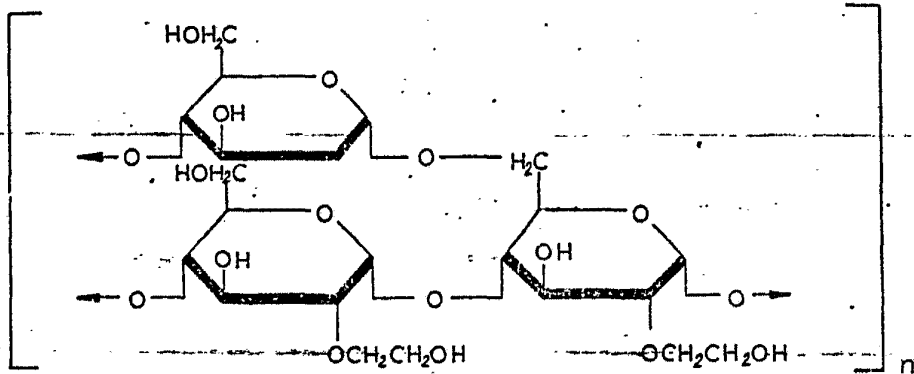
1 claramente en test "in-vitro".

Otra ventaja ha demostrado ser que en ensayos de almacenaje se ha podido comprobar una estabilidad especialmente grande de las globulinas gamma obtenidas de acuerdo con el invento.

EJEMPLO GRAFICO

10

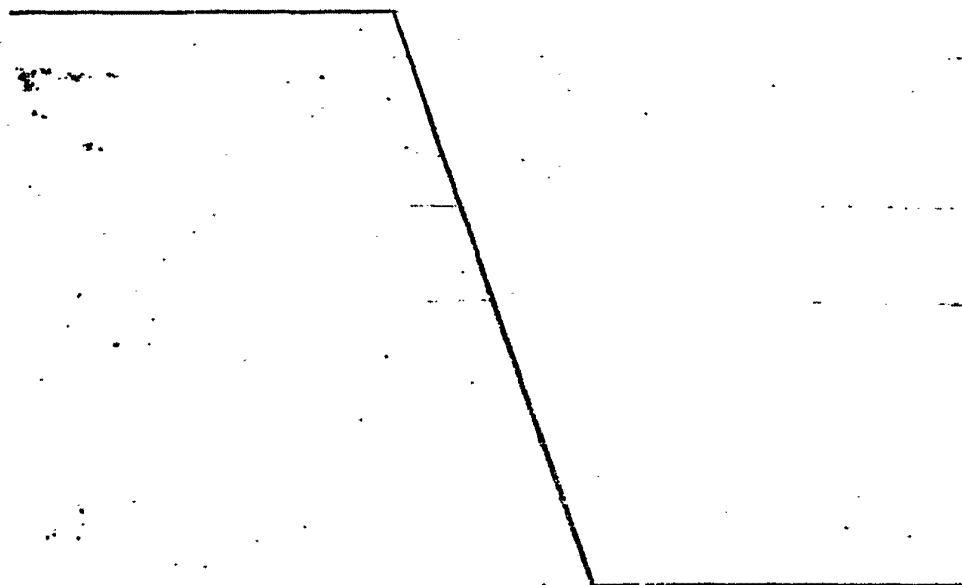
15

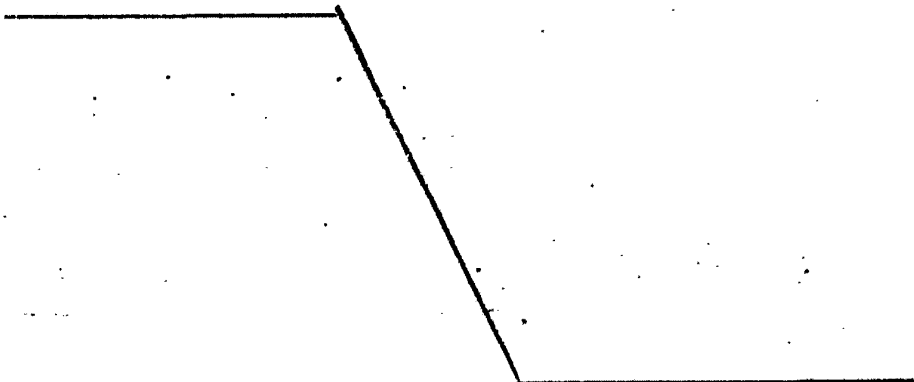


20

25

30





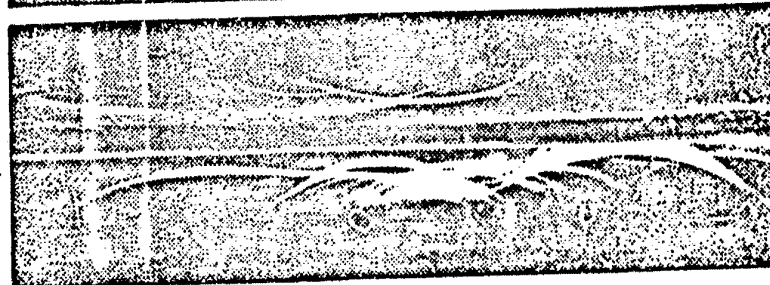
(P)



(c)



(b)



(d)



30

25

20

15

10

5

1

1 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1.- Un procedimiento para elevar la tolerancia intrave-
nosa de globulinas gamma precipitadas de la sangre o de pro-
ductos sanguíneos, caracterizado porque el sedimento de glo-
bulina gamma se disuelve de nuevo en una solución acuosa en
la que existen sustancias macromoleculares, que protegen las
10 moléculas de globulina entre sí y las expulsan de la solu-
ción, tales como fécula hidroxiletílica, gelatinas, dextra-
nos, albúmina, polialcoholes o polivinilos.

15 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación
1, caracterizado porque la solución acuosa contiene fécula
hidroxiletílica, de la que se precipita a continuación la
globulina gamma, siendo recibida de nuevo especialmente en
una solución fisiológica de cloruro de sodio.

20 3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación
2, caracterizado porque el sedimento de globulina gamma se
transforma en una solución tamponada acuosa de fécula hidro-
xiletílica, que tiene un valor pH de 3,5 a 8,0.

25 4.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación
3, caracterizado porque el sedimento se transforma en una
solución de fécula hidroxiletílica de un valor pH de 6,5 a
6,9.

5.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicacio-
nes 2 a 4, caracterizado porque el contenido de fécula hi-
droxiletílica en la solución acuosa asciende a 1 a 30%.

30 6.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación
5, caracterizado porque el contenido de fécula hidroxiletí-
lica en la solución acuosa asciende a 8 a 10%.

1

7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el peso molecular de la fécula hidroxiletífica en la solución oscila entre 1000 y 900.000.

5

8.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA ELEVAR LA TOLERANCIA INTRAVENOSA DE GLOBULINAS GAMMA PRECIPITADAS DE LA SANGRE O DE PRODUCTOS SANGUINEOS.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de once páginas mecanografiadas.

Madrid, 30 diciembre 1.975

BERNARDO UNGRIA
P.P.

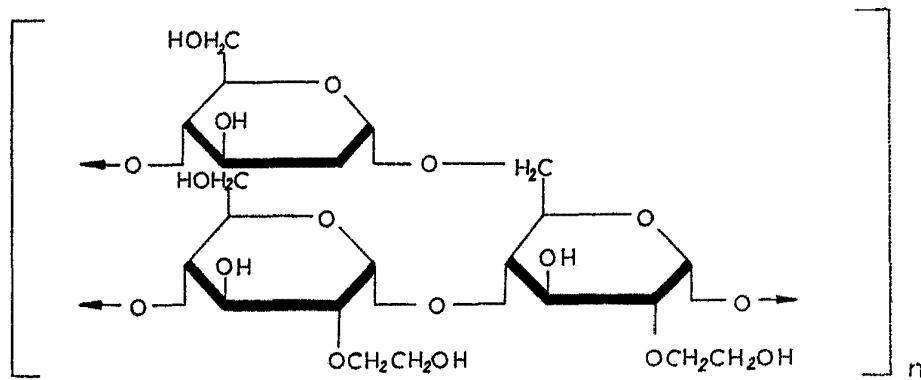
15

20

25

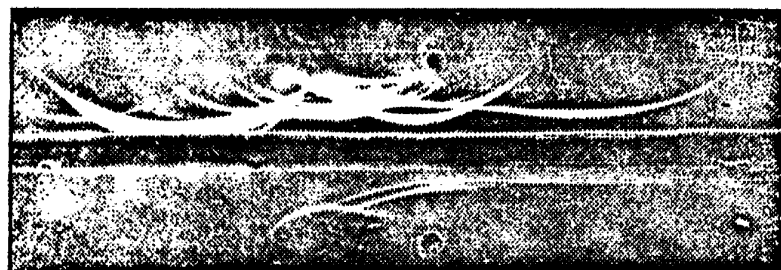
30

Fig.1



ESCALA VARIABLE
 Madrid, 30 de Diciembre 1975
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.

Fig.2



a)



b)



c)



d)

ESCALA VARIABLE
Madrid, 30 de Diciembre 1975
BERNARDO UNGRIA
P.P.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Bernardo Ungria".