



19 ES	11	450208	10 AT
21	22	FECHA DE PRESENTACION	
		27.7.76	

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES: 51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
599.619	28.7.75	estadounidense

54 FECHA DE PUBLICIDAD	55 CLASIFICACION INTERNACIONAL	56 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	

57 TITULO DE LA INVENCION

UN METODO DE PREPARACION DE UNA GAMMA-GLOBULINA ANTI-HE_S A PARTIR DE PLASMA HUMANO.

58 SOLICITANTE (S)

ORTHO DIAGNOSTICS, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Raritan, New Jersey, Estados Unidos.

59 INVENTOR (ES)

William Pollack y Albert McKee, ambos estadounidenses.

60 TITULAR (ES)

El mismo solicitante.

61 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Se describe un método para la producción de un nuevo agente inmunizante. El agente inmunizante es gamma-globulina anti-HB_s esencialmente exenta de fibrinógeno, plasminógeno, globulina 19 S y lípidos, que ha resultado efectivo en la inmunización contra la enfermedad vírica hepatitis B. El método de producción de este material implica el fraccionamiento de plasma humano utilizando un disolvente selectivo y control del pH, de la temperatura y de la fuerza iónica.

10

COMPENDIO DE LA INVENCION

15

Esta invención se refiere a la producción de una nueva gamma-globulina y más especialmente a un método para la producción de una nueva gamma-globulina específica hiper-inmune denominada globulina inmune de la hepatitis B.

20

Desde su aplicación publicada por primera vez en 1945 por Neefe, J.R. y Stokes, J.Jr. en el Journal of the American Medical Association, 145, 128, 1063, casi todos los preparados de globulina inmune humana normales han sido interesantes en la profilaxis de la hepatitis del tipo A. La globulina normal ha sido recomendada para uso rutinario en la prevención de los casos secundarios entre los contactos domésticos expuestos. Solamente algunos lotes ocasionales han presentado una eficacia por debajo de la media para este fin.

25

Por el contrario, sin embargo, el valor de estos preparados de globulina normal para la profilaxis de la infección vírica hepatitis B (HBV) ha sido puesta en cuestión desde hace tiempo. Véase, por ejemplo, Mosley, J.W., Galambos, J.T., Diseases of the Liver (editado por L. Schiff), pág. 410, Filadelfia, 1969 y National Academy of Sciences - National Research Council Committee on Viral Hepatitis, Morbidity and Mortality

30

1 Weekly Report, 1972, 21, 133. Las conclusiones discrepantes
de las diversas investigaciones sobre la eficacia de los pre-
parados de globulina normal en la prevención de la hepatitis
5 del tipo B pueden haber sido el resultado de diversos facto-
res, tales como variaciones en la concentración de anticuer-
pos específicos (anti-HB_s) en los lotes utilizados y la fal-
ta de fiabilidad de la diagnosis en estudios anteriores al
ensayo del antígeno superficial de la hepatitis B (HB_sAg).
En general se está de acuerdo, sin embargo, en que la profila-
10 xis efectiva con la globulina normal es demasiado inconsisten-
te para justificar ninguna recomendación de que sea utiliza-
da en un intento para evitar la enfermedad del tipo B.

15 Específicamente la capacidad de diagnosis de la hepatis
tipo B produjo el reconocimiento de que el contacto estre-
cho y continuado con los portadores puede dar lugar a una
transmisión intra-doméstica y esto ha despertado un gran inte-
rés en la obtención de una globulina inmune que pudiera inmu-
nizar eficazmente contra el tipo B de la enfermedad.

20 Por lo tanto, esta invención proporciona un material
de este tipo así como un método para su producción y utiliza-
ción en la inmunización de huéspedes susceptibles.

DESCRIPCION GENERAL DE LA INVENCION

25 La nueva gamma-globulina inmune anti-HB_s de esta inven-
ción es pura y está esencialmente exenta de fibrinógeno, glo-
bulina 19 S, plasminógeno y lípidos. Se prepara a partir de
plasma humano que contiene preferiblemente un elevado título
de ese anticuerpo. Está al alcance del experto en este campo
el identificar y obtener este plasma como material de partida.
30 Como es sabido, el plasma humano contiene muchos componentes
como albúmina, plasminógeno, globulinas α , β y γ y diversos

1 lípidos. El fraccionamiento de este material para obtener el componente deseado de acuerdo con esta invención depende de la solubilidad de los diversos componentes del plasma a diversas fases y bajo diferentes condiciones.

5 En cada fase de ese fraccionamiento, la separación de la fracción y la eliminación final de los componentes que son indeseables en la globulina anti-HB_e están determinados por el control crítico del pH, de la temperatura, de la concentración de precipitante y de la fuerza iónica del sistema. Por lo tanto, la invención utiliza una serie de etapas para efectuar la separación de los componentes que son indeseables mediante el control de condiciones que alteran la solubilidad de esos componentes.

10 Diversos disolventes orgánicos de constante dieléctrica baja, como las cetonas y los alcoholes, precipitan las proteínas y han sido utilizados en el fraccionamiento del plasma. El disolvente orgánico utilizado en el método de esta invención es preferiblemente metanol, aunque pueden emplearse otros alcanoles inferiores como etanol y propanol. La capacidad para mantener las fuerzas iónicas críticas en las diversas fases del fraccionamiento es facilitada mediante el uso de metanol. Cuando se emplean otros disolventes, se realizarán los cambios apropiados en las condiciones del proceso ya que afectan a la solubilidad.

15
20
25
30 Con objeto de evitar la desnaturalización de las proteínas durante el fraccionamiento, la precipitación se realiza a temperaturas bajas. Como la solubilidad de las proteínas depende de la temperatura, la temperatura seleccionada para cada etapa del fraccionamiento debe ser, por razones de economía, la más baja posible que permita la separación deseada,

1 con objeto de evitar la desnaturalización.

5 Refiriéndonos al diagrama de flujo, la fraccionación transcurre desde el plasma humano completo. El plasma se enfría a unos 0-5°C y después se centrifuga para separar un precipitado insoluble frío de un líquido que sobrenada. Este último se fracciona después para dar el Precipitado I y el Sobrenadante I. El Precipitado I, que está constituido fundamentalmente por fibrinógeno, se desprecia. El Sobrenadante I es fraccionado para dar los Sobrenadantes II + III y los Precipitados II + III. El Sobrenadante II + III, que se desprecia, contiene α y β -globulina y lípidos. El Precipitado II + III está constituido principalmente por β y γ -globulinas e isoaglutininas, pero también contiene protrombina, plasminógeno, colesterol y otros lípidos. El Precipitado II + III, mediante un nuevo fraccionamiento, da Sobrenadante II + III W y Precipitado II + III W. La β -globulina, el colesterol y otros lípidos son separados en gran parte en el Sobrenadante II + III W que se desprecia. El Precipitado II + III W está constituido principalmente por gamma-globulinas, isoaglutininas, plasminógeno y protrombina y algo de β -globulina, colesterol y otros lípidos. Mediante un nuevo fraccionamiento, el Precipitado II + III W da el Sobrenadante III + Precipitado III. El Precipitado III, que se desprecia, contiene isoaglutininas, plasminógeno y protrombina. El Sobrenadante III está constituido principalmente por gamma-globulinas y cantidades minoritarias de fibrinógeno y lípidos. La etapa final del fraccionamiento da lugar al Precipitado II que es gamma-globulina inmune anti-HB_s esencialmente pura, casi completamente exenta de globulina 19 S, plasminógeno y lípidos.

10

15

20

25

30

1 La invención será mejor comprendida mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

5 Un plasma de sangre humana, con un título anti-HB_s de 6000 aproximadamente, se enfría a $1^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El plasma se centrifuga en una supercentrífuga Sharples con tres aletas en la cubeta, a $1^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, alimentando a razón de 1000 ± 50 ml por minuto. El precipitado insoluble frío se desprecia. El pH del líquido que sobrenada se ajusta a $7,2 \pm 0,2$. El contenido en metanol del lote se lleva a $10,7 \pm 0,1$ % (volumen/volumen) mediante la adición de 177 ml de metanol al 71 % (volumen/volumen) por litro de plasma. La solución se agita lentamente a $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y se mantiene a $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante la noche. La solución se centrifuga en una supercentrífuga Sharples con tres aletas en la cubeta a $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, alimentando a un caudal de 1000 ± 100 ml por minuto. Se recoge el Sobrenadante I en un receptáculo provisto de un dispositivo de enfriamiento.

15
20 A cada litro de Sobrenadante I se añaden, con refrigeración, 601 ml de metanol al 71 % (volumen/volumen), 0,88 ml de ácido acético 10N y 0,44 ml de acetato sódico 4N. Esto lleva la concentración de metanol al 33,3 %, la fuerza iónica a 0,086 ig./litro y el pH a 6,9. La solución se lleva a una temperatura de $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y se agita lentamente durante 2 horas. Después la solución se deja en reposo a $-5,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas.

25
30 La solución se centrifuga en una supercentrífuga Sharples con una cubeta de tres aletas a $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, a un caudal de $1000 \text{ ml} \pm 100 \text{ ml}$ por minuto. El Precipitado II + III se saca de la cubeta, se pesa y se almacena a una tempera

1 tura de -20°C .

5 Manteniendo una temperatura de 0°C , el Precipitado II + III se suspende en dos volúmenes (dos veces el peso original del Precipitado II + III) de agua a 0°C en equilibrio con hielo, cortando la pasta con una espátula de acero inoxidable en una vasija de acero inoxidable y agitando hasta que la suspensión es uniforme. Se añaden a la suspensión, con agitación, tres volúmenes (tres veces el peso original del Precipitado II + III) de solución $0,0187\text{M}$ de fosfato disódico. Se añaden 20 volúmenes (20 veces el peso original del Precipitado II + III) de agua a 0°C y se continúa agitando a 0°C durante 30-60 minutos. El pH es $7,2 \pm 0,2$. Para obtener un porcentaje de metanol del $26,7 \pm 0,2 \%$, se añaden 15 volúmenes (15 veces el peso original del Precipitado II + III) de metanol al 71 % (volumen/volumen) a -10°C . La fuerza iónica de la solución es $0,0052 \pm 0,0005$ ig/litro.

10

15

20 La solución se lleva a una temperatura de -5°C y se centrifuga en la supercentrífuga Sharples con una cubeta de tres aletas, una temperatura de $-5,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, a un caudal de 500 ± 50 ml por minuto. El Precipitado II + III W se saca de la cubeta y se pesa.

25 El Precipitado II + III W se suspende en dos volúmenes (dos veces el peso del Precipitado II + III W) de agua de hielo. A la suspensión se añaden dos volúmenes (dos veces el peso del Precipitado II + III W) de acetato sódico $0,175\text{M}$. Se agrega otro volumen (una vez el peso del Precipitado II + III W) de agua de hielo conteniendo $0,216$ ml de solución reguladora de acetato por cada gramo de pasta de Precipitado II + III W. La solución reguladora de acetato se prepara diluyendo 40 ml de ácido acético 10N y 20 ml de acetato sódico

30

1 4N hasta 100 ml con agua destilada. El pH de la solución es
5,2 \pm 0,2. La solución se agita lentamente durante una hora.
Después se añaden 13,5 volúmenes (13,5 veces el peso origi-
5 nal del Precipitado II + III W) de agua de hielo y 8,66 vo-
lúmenes (8,66 veces el peso original del Precipitado II +
III W) de metanol al 71 % (volumen/volumen) mientras se man-
tiene la temperatura a $-6^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La solución se agita len-
tamente durante una hora y se deja en reposo durante la no-
che. La solución contiene metanol al 22,7 % y tiene un pH
10 de 5,2 y una fuerza iónica de 0,015 ig/litro.

La solución se centrifuga en una supercentrífuga
Sharples con una cubeta de tres aletas, una temperatura de
 $-6^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y a un caudal de 500 ± 50 ml por minuto. Se mide
el volumen de Sobrenadante III. El Precipitado III se des-
15 precia.

El Sobrenadante III se trata con 0,4 % en peso/volumen
de Celite 512 y se agita durante 20 minutos. La mezcla se
filtra a través de un filtro-prensa Eitel que contiene fil-
tros D-8.

20 Se prepara una solución reguladora de acetato a pH 5,2
como sigue: se llevan a 100 ml con agua destilada 25 ml de
acetato sódico 4N y 3 ml de ácido acético 10N. La solución
reguladora de acetato se diluye 100 veces con metanol al
22,7 %. Esta solución tiene una fuerza iónica de 0,01 ig/li-
25 tro. Un filtro-prensa Eitel se recubre previamente con la
solución reguladora de acetato más Celite 512 ($0,5 \text{ g/pulgada}^2$
($6,25 \text{ cm}^2$) de superficie de filtro) utilizando 40 ml de so-
lución reguladora de acetato-metanol/ pulgada^2 ($6,25 \text{ cm}^2$) de
superficie de filtro. Se filtra el Sobrenadante III y al fil-
30 trado se añaden 50 milimoles (2,923 g) de cloruro sódico y

1 7,65 ml. de bicarbonato sódico 1M por litro de Sobrenadante
III filtrado. El pH del filtrado es $7,2 \pm 0,2$.

5 Al filtrado se añaden 160 volúmenes de metanol al
100 % a una temperatura inferior a -5°C . La mezcla se agita
lentamente durante una hora a una temperatura de $-6,5^{\circ} \pm$
0,5°C. La mezcla se deja en reposo durante la noche.

10 La solución se centrifuga en una supercentrifuga
Sharples con una cubeta de tres aletas, a una temperatura
de $-6^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y a un caudal de 500 ± 50 ml por minuto. Se
desprecia el líquido sobrenadante.

15 Se separa el Precipitado II, se suspende en cuatro volú-
menes de agua de hielo y se liofiliza. El polvo liofilizado
se pesa y se conserva a una temperatura inferior a -5°C .

20 El Precipitado II preparado mediante este ejemplo es
gamma-globulina inmune anti-HB_s con una pureza del 99 %, .
exenta de plasminógeno, fibrinógeno, lípidos y globulinas
19 S.

EJEMPLO 2

25 Se preparan 2 globulinas inmunes humanas como solucio-
nes al $13,5 \pm 1,5$ g/dl por el procedimiento del Ejemplo 1.
El plasma humano de partida deriva de unidades de plasma que
se sabe que contienen anti-HB_s en títulos entre moderados y
altos por hemoaglutinación pasiva. La globulina de control
deriva de unas unidades de plasma sin anti-HB_s detectable
por hemoaglutinación pasiva. Ambos preparados de globulina
30 inmune son dispensados como volúmenes de 5 ml en viales idé-
nticos de una sola dosis, clasificados con una designación de
dos dígitos atribuida al azar. Ambos preparados complen to-
das las normas aplicables para la "Globulina Inmune (Humana)"
del Bureau of Biologics, Food and Drug Administration, De-

1 departamento de Estados Unidos de Salud, Educación y Bienestar.
La globulina inmune a la hepatitis B contenía 442 µg de anti-
HB_s específico/ml mediante un análisis radioinmune en fase
5 sólida, cuantitativo. Su título anti-HB_s por hemaglutinación
pasiva era 1:200.000 y 1:150.000, respectivamente, contra
células recubiertas con los subtipos adw y ayw de HB_sAg.

 Durante el periodo de 29 meses transcurrido entre Julio
de 1972 y Diciembre de 1974, se identificaron 96 pacientes hu-
manos de hepatitis icterica, con síntomas, indicios y resul-
10 tados de laboratorio compatibles con una hepatitis viral agu-
da y un ensayo positivo de HB_sAg confirmado por subtipifica-
ción o especificidad. Durante este periodo, estos pacientes
expusieron a un total de 100 compañeros sexuales con los que
vivieron durante un periodo transcurrido entre 2 semanas y
15 2 meses antes de la aparición de la enfermedad. Se formaron
dos grupos de tratamiento con los cónyuges de estos pacientes
y se administró una sola inyección intramuscular de 5 ml de
la globulina inmune anti-HB_s, preparada como se ha descrito
antes. Otros criterios adicionales para el cónyuge: incluían
20 la falta de historia de hepatitis o ictericia previas o de
enfermedad hepática crónica, que no fueran usuarios de inyec-
tables, que no hubiera historia de transfusiones dentro de
los 6 meses previos y la disponibilidad de seguir los sínto-
mas durante los 10 meses subsiguientes.

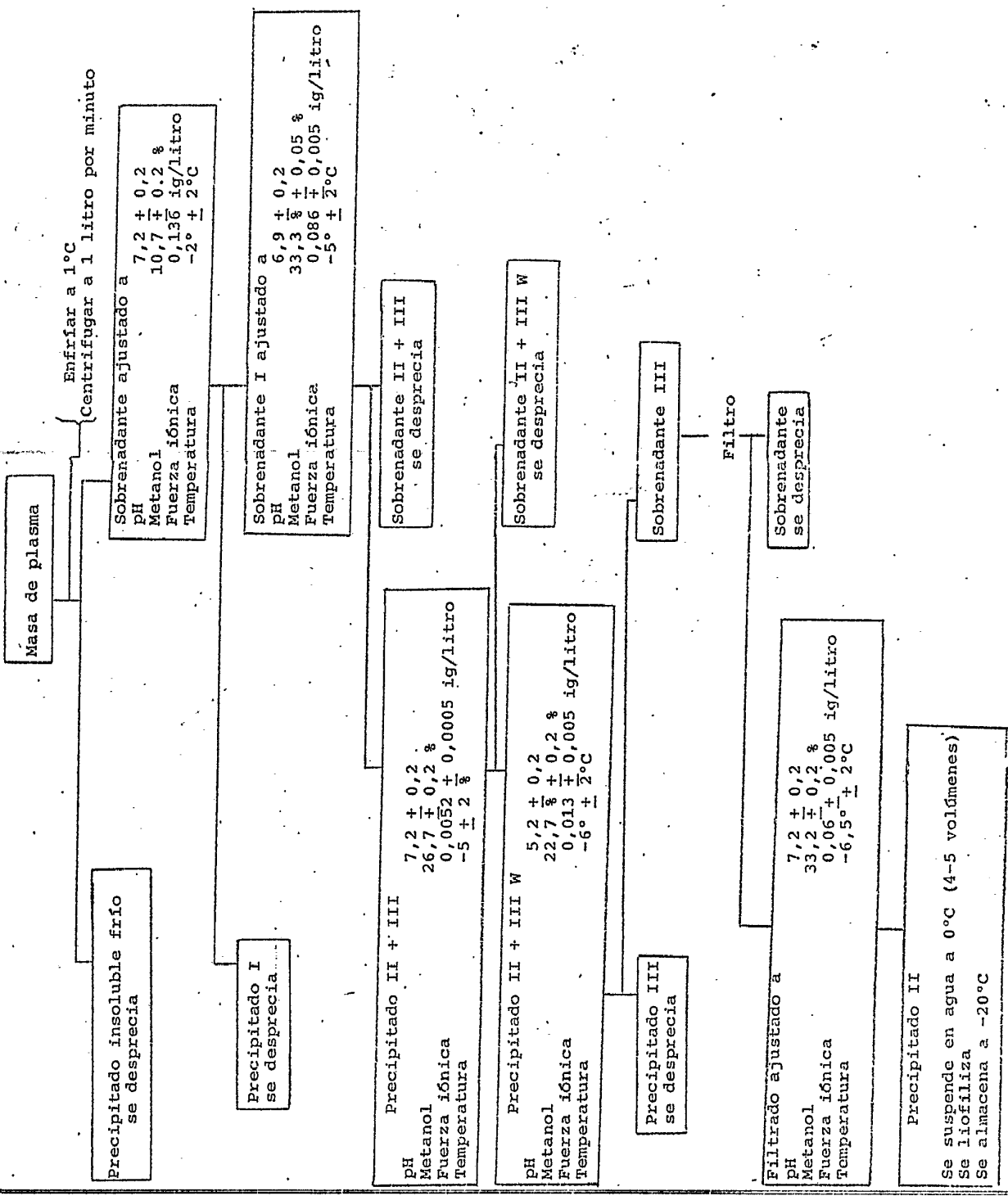
 Entre los 100 cónyuges, 47 fueron colocados al azar en
el grupo tratado y 53 en el grupo de control. Debido a exclu-
siones de un tipo u otro, quedaron 33 para el análisis en el
grupo tratado y 40 en el grupo de control. En el momento pre-
sente, 58 de los 73 cónyuges elegibles habían sido estudiados
30 durante 150 días o más después de la inyección de la globuli-

1 na de esta invención.

Los intervalos transcurridos desde el reconocimiento de la ictericia en los pacientes y la inyección de los cónyuges osciló entre 7 días antes a 30 días después con una media de 9 días. En total, hubo 11 casos de hepatitis registrada en los cónyuges, de los cuales 9 eran de hepatitis icterica. En el grupo de control se produjeron 9 casos de hepatitis B y ninguno en los cónyuges tratados con la globulina inmune de la hepatitis B de esta invención.

5
10 En el sentido utilizado en este estudio, el término hepatitis icterica se define como ictericia sospechosa de la piel o de los ojos, confirmada por un nivel de bilirrubina en suero de 2 mg/dl o más alto. La hepatitis anictérica se define como hepatitis sintomática confirmada por niveles y diagramas apropiados de actividades de aminotransferasa en suero pero sin que la bilirrubina observada en suero llegara al nivel de 2,0 mg/dl. Ambas formas icterica y anictérica de hepatitis sintomática fueron definidas como enfermedad del tipo B basándose en los siguientes criterios: (1) aparición de novo de HB_sAg; (2) aparición de novo de anti-HB_s en los receptores de globulina de control; (3) un título declinante de anti-HB_s después de la inyección de globulina inmune a la hepatitis seguido de un aumento de cuatro veces o mayor. Los casos sintomáticos que no cumplían estos criterios fueron clasificados como hepatitis "no B".

15
20
25
30 Una cantidad efectiva del material de esta invención adecuada para impedir la incidencia de la enfermedad virica hepatitis B en huéspedes susceptibles oscila preferiblemente entre 25 y 50 µg de anti-HB_s específico/ml por kg de peso corporal. El material es administrado parenteralmente y de preferen



1

5

10

15

20

25

30

1
5
10
15
20
25
30

Masa de plasma

Precipitado insoluble frío se desprecia

Sobrenadant
pH
Metanol
Fuerza ióni
Temperatura

Precipitado I se desprecia

Sobrenadant
pH
Metanol
Fuerza ióni
Temperatura

Precipitado II + III	
pH	7,2 ± 0,2
Metanol	26,7 ± 0,2 %
Fuerza iónica	0,0052 ± 0,0005 ig/litro
Temperatura	-5 ± 2 °

Sobrenadant se des

Precipitado II + III W	
pH	5,2 ± 0,2
Metanol	22,7 ± 0,2 %
Fuerza iónica	0,013 ± 0,005 ig/litro
Temperatura	-6° ± 2°C

Sobrenadant se desp

Precipitado III se desprecia

Sobrenadante

Filtrado ajustado a	
pH	7,2 ± 0,2
Metanol	33,2 ± 0,2 %
Fuerza iónica	0,06 ± 0,005 ig/litro
Temperatura	-6,5° ± 2°C

Filtro
Sobrenadante se desprecia

Precipitado II
Se suspende en agua a 0°C (4-5 volúmenes)
Se liofiliza
Se almacena a -20°C

Masa de plasma

Enfriar a 1°C
Centrifugar a 1 litro por minuto

Sobrenadante ajustado a	
pH	7,2 ± 0,2
Metanol	10,7 ± 0,2 %
Fuerza iónica	0,136 ig/litro
Temperatura	-2° ± 2°C

Sobrenadante I ajustado a	
pH	6,9 ± 0,2
Metanol	33,3 % ± 0,05 %
Fuerza iónica	0,086 ± 0,005 ig/litro
Temperatura	-5° ± 2°C

Sobrenadante II + III
se desprecia

0,2
0,2 %
+ 0,0005 ig/litro
± 2°C

Sobrenadante II + III W
se desprecia

0,2
+ 0,2 %
+ 0,005 ig/litro
± 2°C

Sobrenadante III

Filtro

Sobrenadante
se desprecia

0,2
0,2 %
0,005 ig/litro
± 2°C

menes)

1 cía intramuscularmente mediante una sola dosis inyectada.

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

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de preparación de una gamma-globulina anti-HB_s a partir de plasma humano, que comprende las etapas de:

10 (a) enfriar el plasma humano a 1°C aproximadamente y separar de dicho plasma un primer sobrenadante y un primer precipitado;

15 (b) añadir metanol a dicho primer sobrenadante y ajustar la temperatura a -2°C aproximadamente, siendo la cantidad de metanol entre 10,5 % y 10,9 %, el pH entre 7 y 7,4 y la fuerza iónica 0,136 ig/litro y separar del sistema líquido resultante un segundo precipitado y un segundo sobrenadante;

20 (c) agregar metanol al segundo sobrenadante y ajustar la temperatura a -5°C aproximadamente, siendo la cantidad de metanol entre 33,25 % y 33,35 %, el pH entre 6,7 y 7,1 y la fuerza iónica entre 0,081 y 0,091 ig/litro y separar del sistema líquido resultante un tercer precipitado y un tercer sobrenadante;

25 (d) añadir metanol al tercer precipitado y ajustar la temperatura a -5°C aproximadamente, siendo la cantidad de metanol entre 26,5 % y 26,9 %, el pH entre 7,0 y 7,4 y la fuerza iónica entre 0,0047 y 0,0057 ig/litro y separar del sistema líquido resultante un cuarto precipitado y un cuarto sobrenadante;

30 (e) añadir metanol al cuarto precipitado y ajustar la temperatura a -6°C aproximadamente, siendo la cantidad de metanol entre 22,5 % y 22,9 %, el pH entre 5,0 y 5,4 y la

1 fuerza iónica entre 0,008 y 0,018 ig/litro y separar del sistema líquido resultante un quinto precipitado y un quinto sobrenadante;

5 (f) añadir metanol al quinto sobrenadante y ajustar la temperatura a $-6,5^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, siendo la cantidad de metanol entre 33,0 % y 33,4 %, el pH entre 7,0 y 7,4 y la fuerza iónica entre 0,055 y 0,065 ig/litro y separar el sistema líquido resultante en un sexto precipitado y un sexto sobrenadante.

10 2. Un método según la Reivindicación 1, donde el sexto precipitado es liofilizado.

15 3. Se reivindica por último como objeto sobre el que se ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN METODO DE PREPARACION DE UNA GAMMA-GLOBULINA ANTI-HB_s A PARTIR DE PLASMA HUMANO.

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

Madrid, 27 julio 1.976
BERNARDO UNGRIA

D.P.



20

25

30