

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

CONCEDIDA

ES

(11)
(21)
(22)

NUM. REG.
457482
FECHA DE PRESENTACION
-2 ABR. 1977

(10) A 1



25 ENE. 1978

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO 1628/76	(32) FECHA 6 Abril 1976	(33) PAIS Dinamarca
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 37/04	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(64) TITULO DE LA INVENCION "Método para la obtención de inmunoglobulina"		
(71) SOLICITANTE (S) NORDISK INSULINLABORATORIUM		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Ved Stadion 2, DK-2820 Gentofte, Dinamarca		
(72) INVENTOR (ES) Jørgen Frederik Hansen		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE M. Curell Sufiol		

76.265 Spa. GS-/sh
EX-DK

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de NORDISK INSULINLABORATORIUM, de nacionalidad danesa, domiciliada en Ved Stadion 2, DK-2820 Gentofte, Dinamarca, por "Método para la obtención de inmunoglobulina", con prioridad de la solicitud danesa 1628/76 de fecha 6 Abril 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un método para la obtención de inmunoglobulina adecuada para la administración intravenosa, por precipitación fraccionada de plasma o suero sanguíneos o una fracción de los mismos, con un di- o poliol policondensado. - - - - -

5.

Las inmunoglobulinas, comprendiendo las gammaglobulinas, tienen interés terapéutico puesto que son adecuadas para la fabricación de preparaciones inmunizantes. - - -

10. Se halla inmunoglobulina en el plasma sanguíneo de origen animal, a partir del cual puede obtenerse por va

- rios procesos de precipitación y purificación. De la misma puede obtenerse gammaglobulina como disoluciones concentradas por medio de un método desarrollado por Cohn et al, cf. J. Clin. Invest. Chem. Soc., 68, 479-75 (1946). Según Cohn, es
5. posible obtener una fracción II que es un concentrado al 16,5% y que puede inyectarse intramuscularmente. - - - - -

- En dicho método de la técnica anterior se forman agregados moleculares de gammaglobulina que hacen que los productos sean inadecuados para la administración intravenosa. Por lo tanto, el método de Cohn comprende la precipitacion con alcohol que tiene un efecto de expulsión del agua y que puede conducir a una desnaturalización irreversible, por lo que la globulina se hace anticomplementaria. Se ha intentado evitarlo por medio de procesos especiales de separación y/o por modificación química de la gammaglobulina. - -
- 10.
- 15.

- Por lo tanto, la técnica anterior enseña un procedimiento mejorado de fraccionación en el cual la gammaglobulina se precipita a partir del plasma sanguíneo por medio de polietilenglicol (PEG) como precipitante, cf. patente US
20. 3.415.804. Esto elimina la indeseada desnaturalización pero la pureza del producto precipitado es insatisfactoria. - - -

- Según la solicitud de patente danesa 6355/73, este proceso de precipitación puede mejorarse substituyendo el polietilenglicol por un copolímero en bloques de óxido de
25. etileno y polímero de polioxipropileno de una naturaleza esg

pecificada adicionalmente y observando algunas condiciones específicas de precipitación. - - - - -

5. De esta manera es posible mejorar el rendimiento de obtención de la gammaglobulina. Los productos precipitados, sin embargo, no son siempre de pureza satisfactoria con una actividad anticomplementaria suficientemente baja. - - -

10. La presente invención se basa en la observación de que la precipitación fraccionada de inmunoglobulinas, conocidas también como gammaglobulinas, por medio de polietilenglicol u otro di- o poli^{ol} policondensado, puede hacerse aprecia- blemente más específica si la precipitación se realiza en pre- sencia de un ácido mono- o polialcanoico que tenga de 4 a 12 átomos de carbono, con lo que se eliminan entre otros el fi- brinógeno y las lipoproteínas. - - - - -

15. En el método según la invención se obtiene, de ma- nera simple y con alto rendimiento, inmunoglobulina purifica- da de un grado sorprendentemente alto de pureza. El rendi- miento es igual al que es posible obtener por medio del mejor de los anteriores métodos. - - - - -

20. El método reivindicado puede utilizarse con cual- quier di- o poliglicol policondensado, tal como polietilen- glicol de pesos moleculares variables, por ejemplo de 2.000 a 12.000 y, preferentemente, de 4.000 a 6.000, o polipropilen- glicol. También son adecuados copolímeros de óxido de etileno

con óxido de polipropileno o poliéteres. - - - - -

Es adecuado como ácido mono- o polialcanoico cualquier ácido alcanoico que tenga de 4 a 12 átomos de carbono. Se prefiere, según la invención, un ácido alcanoico que tenga de 6 a 9 átomos de carbono, preferentemente el ácido caprílico. Los ejemplos de otros ácidos alcanoicos adecuados son ácido caproico y ácido nonánico. También pueden utilizarse ácidos alcanoicos ramificados. Cuando se utilizan ácidos alcanoicos superiores, tales como los que tienen de 9 a 12 átomos de carbono, puede ser ventajoso incorporar adicionalmente uno o más grupos carboxilo con vistas a mejorar la solubilidad en agua. Se logra el mismo efecto por medio del uso de ácidos alcanoicos que tienen sustituyentes que contienen, por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo o grupos amino. - - - - -

La disolución que contiene inmunoglobulina se mezcla ventajosamente con de 1 a 8 por ciento en peso de polietilenglicol u otro diol o poliol policondensado junto con de 0,1 a 5 por ciento en peso de ácido caprílico u otro ácido alcanoico que tenga de 4 a 12 átomos de carbono, efectuándose ventajosamente la precipitación con ácido alcanoico, según la invención, a un pH de 3 a 7 y preferentemente de 4,5 a 5,5. - - - - -

El método según la invención se ilustrará adicionalmente a continuación por medio de algunos ejemplos. - - -

EJEMPLO 1

- Se ajustan 415 ml de plasma sanguíneo humano que contiene 10 g de inmunoglobulina por litro de plasma a un pH de 5,0. Se añade PEG 3.000 hasta una concentración de 6% y la disolución se deja reposar durante 45 minutos. El precipitado, que está constituido principalmente por fibrinógeno, se separa por centrifugación, y la fase líquida se ajusta a un pH de 7,0. Después de añadir más PEG 3.000 para obtener una concentración del 12%, la mezcla se deja reposar durante 45 minutos. Entonces la mezcla se centrifuga y se saca la fase líquida que contiene albúmina y alfa- y beta-globulina. El precipitado compuesto por inmunoglobulina impura se redissuelve en una disolución de cloruro sódico al 0,9% para obtener una concentración proteínica de unos 4%. La disolución se filtra hasta que es transparente utilizando un filtro Seitz^R EK. La disolución formada se mezcla con 5 g de ácido caprílico y 30 g de PEG 3.000 por litro de disolución y se ajusta a pH de 4,9. Después de dejar en reposo durante 2 horas a 20°C, la mezcla se centrifuga y la fase líquida se filtra para obtener una disolución transparente. Esta disolución se ajusta a pH = 7,0 y se añade PEG 3.000 hasta una concentración de 12% de PEG. Esto origina la precipitación de la inmunoglobulina pura que se recupera por centrifugación y secado. El rendimiento del producto es de 60%. El grado de pureza, determinado por DISC PAGE (con 5% de poliacrilamida) presenta substancialmente sólo dos bandas correspondientes a
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

IgG y IgM, respectivamente. El análisis se realiza por aplicación de 500 μ g de producto. - - - - -

5. En inmunolectroforesis de Grabar y William, utilizando anticuerpos de conejo contra protefna sérica humana total se hallan substancialmente sólo tres arcos, correspondientes a IgG, IgM e IgA, respectivamente. - - - - -

10. El producto purificado puede convertirse, si se desea, en una preparación inyectable intravenosamente por disolución en 0,9% de disolución de cloruro sódico hasta una concentración proteínica de unos 5 por ciento. La preparación se distingue por una actividad anticomplementaria extremadamente baja, razón por la cual es particularmente adecuada para la administración intravenosa. - - - - -

EJEMPLO 2

15. Se repite el proceso según el Ejemplo 1, excepto que el plasma sanguíneo humano se substituye por plasma de cerdo. - - - - -

EJEMPLO 3

20. Se repite el proceso según el Ejemplo 1, excepto que el plasma sanguíneo humano se substituye por suero sanguíneo. - - - - -

EJEMPLO 4

- Se mezclan 100 l de plasma o suero con 100 l de disolución de PEG 3.000 a 600 g/l. El pH se ajusta a 6,5. El precipitado se separa por centrifugación y se redisuelve
5. en 100 l de agua destilada mezclada con 0,015 M de NaCl. Se añaden 40 g de PEG 3.000 por litro y 5 g de ácido caprílico por litro. El pH se ajusta a 5,0. Tiempo de reposo de 45 minutos. El precipitado se separa por centrifugación. El centrifugado se mezcla con otros 40 g de PEG 3.000 por litro.
10. El pH se ajusta a 7,5. El precipitado se separa por centrifugación y se redisuelve en agua destilada con 0,002 M de NaCl. La disolución se filtra hasta la transparencia (por ejemplo filtro Seitz^R EK). La concentración de proteínas debe ser de 50-100 g/l. Se añaden 20 g de DEAE-Sephadex-A25^R
15. por 100 g de proteínas. Después de dejar reposar durante 60 minutos mientras se agita, se separa la DEAE-Sephadex por filtración. Se repite el tratamiento con DEAE-Sephadex. Después de filtración estéril se obtiene una preparación de inmunoglobulina G libre de anticomplementariedad y adecuada
20. para la administración intravenosa. - - - - -

A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -

REIVINDICACIONES

5. 1.- Método para la obtención de inmunoglobulina, caracterizado porque comprende la precipitación fraccionada de plasma o suero sanguíneos o una fracción de los mismos con un di- o poli-ol policondensado, en presencia de un ácido mono- o polialcanoico que tiene de 4 a 12 átomos de carbono.

10. 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido mono- o polialcanoico es un ácido alcanoico que tiene de 6 a 9 átomos de carbono, preferentemente ácido caprílico. - - - - -

3.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por efectuar la precipitación con ácido alcanoico a un pH de 3 a 7, preferentemente de 4,5 a 5,5. - - - - -

4.- "METODO PARA LA OBTENCION DE INMUNOGLOBULINA".

15. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de ocho hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID - 2 ABR. 1977

P.A. M. CURELL SUÑOL

