



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

465180

11	12	13
11	21	13 A1
FECHA DE PRESENTACION		
17-12-77		

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
P 26 58 334.6	23-12-76	Rep. Federal Alemana
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G07G, A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PREPARADOS DE INMUNOGLOBULINAS"		
71 SOLICITANTE (S)		
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT		(HOE 76/B C26)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana		
72 INVENTOR (ES)		
Hans Müller		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P.- 67.308)

POOR
QUALITY

1 La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de preparados de inmunoglobulinas con fijación de complemento disminuída.

5 Los preparados de inmunoglobulinas preparados por fraccionamiento de suero, en especial a partir de suero humano, tienen una importancia esencial, a causa de sus propiedades de anticuerpos, como agentes profilácticos y terapéuticos para el refuerzo de reacciones corporales de defensa.

10 Hasta ahora los preparados de inmunoglobulinas manifestaban ser adecuados en lo esencial sólo para la administración intramuscular: en el caso de administraciones intravenosas los receptores reaccionaban más o menos acusadamente con formas sintomáticas anafilactoides. Sin embargo, una administración intravenosa de los
15 preparados de inmunoglobulinas es muy deseable, puesto que éstos entran más rápidamente en acción en el organismo.

20 Se supone que las reacciones secundarias anafilactoides se deben a la fijación del complemento del suero por la inmunoglobulina administrada. Por consiguiente, se ha intentado de muchas maneras modificar las inmunoglobulinas de modo tal que se conserve su actividad como anticuerpo, pero que la magnitud de la fijación
25 de complemento se reduzca en un grado tal que las inmu-

1 noglobulinas modificadas puedan ser empleadas para una
administración intravenosa. Es conocido modificar las
5 inmunoglobulinas mediante una degradación enzimática,
de modo que se separen los lugares de fijación del com-
plemento, pero que el resto de las moléculas quede aún
en situación de fijar los antígenos. Tal preparado se
administra con buen éxito por vía intravenosa.

10 En algunos casos la inmunoglobulina reduci-
da de tamaño en su molécula, a causa del tiempo de semi-
vida en el organismo comparativamente acortado, se consi-
dera menos satisfactoria que los preparados de inmunoglo-
bulina con peso molecular prácticamente inalterado.

15 También está descrita la reacción de inmuno-
globulinas con agentes de alcoholación y de acilación,
para la preparación de inmunoglobulinas administrables
por vía intravenosa.

20 Además son conocidos procedimientos según
los cuales las inmunoglobulinas son desdobladas por re-
ducción de los enlaces disulfuro intramoleculares, y
a continuación los grupos sulhidrilo formados son alco-
hilados.

25 Se ha intentado ya también desdoblar sulfito
líticamente los enlaces disulfuro en la molécula de inmu-
noglobulina, para lo cual se emplean concentraciones re-
lativamente elevadas de sulfito o de tetrionato. El em

1 pleo de sulfito conjuntamente con iones cúpricos condujo
a productos evaluados como malos.

5 La presente invención parte de la idea de que la
parte esencial de las reacciones de incompatibilidad en la
administración de gamma-globulinas comerciales por vía in-
travenosa no es atribuible a la molécula de gamma-globuli-
na propiamente dicha, sino a las estructuras derivadas del
estado natural de las inmunoglobulinas.

10 Por consiguiente, son objeto de la invención pre-
parados de inmunoglobulinas y un procedimiento para su pre-
paración, según el cual, por medios sulfitolíticos se im-
pide la formación de estructuras fijadoras de complemento,
o se modifican o se eliminan por adsorción las estructuras
ya presentes, de modo que no sean capaces, o lo sean sólo
15 poco, de fijar el complemento.

20 Los preparados de inmunoglobulinas según la in-
vención se obtienen por un procedimiento que está caracte-
rizado porque una fracción de inmunoglobulina, obtenible
según procedimientos conocidos de fraccionamiento de plas-
ma sanguíneo, se trata con una concentración baja de un --
agente sulfitolítico y/o con una cantidad de un fosfato po-
co soluble en agua, suficiente para la reducción de la fi-
jación de complemento.

25 Una pequeña concentración de un agente sulfitolí-
tico representa en el sentido de la invención una concen-

1 tración > 0 pero $< 5 \cdot 10^{-2}$ moles/litro, de preferencia
2 - $4 \cdot 10^{-3}$ moles/litro.

5 Como agente sulfitolítico se emplea por regla --
general sulfito. Sin embargo, según la invención se pre-
fiere un disulfito, tal como disulfito sódico, y ventajoso-
6 samente en una concentración de $1,3$ a $3,6 \cdot 10^{-3}$ moles/li-
tro. Conjuntamente con sulfito pueden emplearse sustan-
cias oxidantes, tales como ditionito, e iones de metales
pesados, tales como iones de cobre divalente. Según la
10 invención éstos pueden ser empleados en el margen desde
 > 0 pero $< 5 \cdot 10^{-3}$ moles/litro; por regla general --
1/10 de la cantidad, referida a la molaridad, del agente
sulfitolítico.

15 La temperatura a la que la sustancia sulfitolíti-
ca se añade a la solución de inmunoglobulinas no es críti-
ca, con tal de que no se presenten temperaturas significa-
tivamente superiores a 50°C . Preferentemente el procedi-
miento se lleva a cabo a una temperatura entre $+5^{\circ}\text{C}$ y 25°C .
A pesar de esta afirmación general es comprobable que las
20 temperaturas ejercen una influencia sobre el procedimien-
to, toda vez que a temperaturas más altas son necesarias
concentraciones menores del agente reductor.

25 También el tiempo de reacción está en relación
inversa con la concentración de los agentes sulfitolíti-
cos. La sulfitólisis de la fracción de inmunoglobulinas

1 se lleva a cabo por regla general durante 5 - 90 horas.

La reacción se termina por la separación de los agentes sulfitolíticos y de las inmunoglobulinas. Para -- ello, convenientemente, se precipitan las inmunoglobulinas.

5 Otra posibilidad consiste, por ejemplo, en la eliminación de los agentes sulfitolíticos por diálisis.

Ha manifestado ser conveniente realizar el tratamiento de los preparados de inmunoglobulinas obtenibles según el estado actual de la técnica, no solamente en una
10 última etapa de la reacción. Más bien, es más ventajoso hacer seguir últimas etapas de purificación, como las que son generalmente habituales en la preparación de inmunoglobulinas, al procedimiento según la invención.

El material de partida para el procedimiento se
15 según la invención es una inmunoglobulina obtenible según el estado actual de la técnica. Esta sustancia se designa en la bibliografía de modos diversos como gamma-globulina, - IgG e inmunoglobulina G. Consta predominantemente de la llamada fracción 7 S, con un peso molecular de aproximada-
20 mente 160.000. Pueden ser empleadas según la invención tanto las inmunoglobulinas obtenibles de sueros mixtos como también las de donantes especialmente inmunizados. Estas son las llamadas hiperinmunoglobulinas con contenidos superiores al valor medio de anticuerpos orientados espe-
25 cíficamente contra determinados antígenos. Como ejemplo

1 se mencionará aquí la inmunoglobulina de las paperas. Los
materiales de partida adecuados para el procedimiento se-
gún la invención son obtenibles a partir de plasma sangui-
neo por procedimientos habituales, tal como por ejemplo --
5 por la precipitación salina fraccionada del plasma, o por
precipitación con disolventes orgánicos, en especial por
etanol, con las diferentes variantes del procedimiento,
que se basan en los trabajos fundamentales de Cohn y otros,
J. Am. Chem. Soc., 68, (1946), páginas 449 y siguientes.

10 Especialmente adecuada como material de partida
es una fracción que contiene γ -globulina, que según Cohn
es citada como fracción II y III, y según Nitschmann como
fracción A. Tales fracciones contienen, junto a γ -globu-
lina, además α - y β -globulina, así como pequeñas canti-
15 dades de albúmina. La proporción de γ -globulina es de
aproximadamente 40 - 80 % en peso, referido a la cantidad
de proteínas totales.

Ha manifestado ser conveniente disolver en agua
o en una solución poco concentrada, preferentemente al --
20 0,3 - 0,9 por ciento, de una sal neutra, tal como sal co-
mún, una fracción de gamma-globulina aún no purificada,
resultante en el procedimiento de fraccionamiento con al-
cohol, por regla general la pasta resultante en el fraccio-
namiento de la albúmina. Después de la disolución, la pro-
25 teína debe estar convenientemente en una concentración de

04117

1 0,5 a 15 %, de preferencia entre 1 y 5 % (peso/volumen).
A esta solución, a un valor de pH entre 4 y 8, preferente-
mente a pH 5,0 a 6,0, se le añade el agente sulfitolítico
5 (por ejemplo $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ o Na_2SO_3) y si se desea una sal de
un metal pesado (por ejemplo CuSO_4), y en tal caso se man-
tiene una temperatura entre 5 y 50°C.

El valor del pH de la mezcla de reacción puede
desviarse de su valor inicial durante la reacción, sin que
esto tenga consecuencias desfavorables. Después de la --
10 reacción con los agentes sulfitolíticos se puede proseguir
inmediatamente la purificación posterior de la inmunoglo-
bulina, de modo habitual.

Ante todo se ha acreditado la inclusión de una
adsorción en un fosfato difícilmente soluble en agua, en
15 la etapa del procedimiento de la purificación posterior,
puesto que el producto final de la purificación de la in-
munoglobulina, tratado de este modo, presenta una fijación
de complemento reducida.

Así por ejemplo, se puede preparar "in situ" en
20 la solución fosfato de aluminio, a partir de AlCl_3 y --
 Na_3PO_4 . A continuación se pueden fijar al fosfato de alu-
minio, junto a impurezas, también aglomerados de la inmu-
noglobulina fijadores de complemento. También el fosfato
cálcico es utilizable para la eliminación de impurezas y
25 de sustancias fijadoras de complemento.

1 5 - 90 horas después de la adición de los agen-
tes sulfitolíticos se pueden separar las inmunoglobulinas
por precipitación, por ejemplo con etanol, de modo conoci-
do de por sí. También es realizable una purificación so-
5 bre un cambiador de iones. Si se emplea un cambiador de
cationes a un valor del pH débilmente ácido, se obtienen
inmunoglobulinas especialmente puras. Los contenidos resi-
duales de cobre pueden ser eliminados por compuestos for-
madores de quelatos con metales, incluso en forma de cam-
10 biadores de iones.

 Respecto a la capacidad de fijación de comple-
mento, los preparados de inmunoglobulinas así obtenibles,
debido a la sulfitolisis parcial realizada, son fijadores
de complemento más débiles que el material de partida. Si
15 se desea, este efecto puede ser reducido aún más por la
adsorción de actividad fijadora de complemento.

 Independientemente del éxito de purificación de-
seado al mismo tiempo, se logran resultados especialmente
buenos respecto a la reducida fijación de complemento si
20 las fracciones de inmunoglobulinas se tratan con un fosfa-
to poco soluble en agua. Para ello se emplean preferente-
mente fosfato de aluminio o fosfato de calcio.

 Para ello son favorables cantidades de 0,005 a
0,1 moles/litro. Los adsorbentes se preparan conveniente-
mente en la solución de inmunoglobulinas propiamente dicha,
25

1 por adición de un catión soluble en agua y de un fosfato
soluble en agua, de los que es sabido que pueden formar
entre sí fosfatos difícilmente solubles. Convenientemente
el valor del pH se mantiene para ello entre 4 y 8,5, pre-
5 firiéndose para la adsorción de actividad fijadora de com-
plemento con ayuda de AlPO_4 , valores de pH entre 4 y 6, y
para fosfatos de metales alcalinotérreos, tales como el
fosfato cálcico, valores de pH entre 5,8 y 8,5. Cationes
solubles en agua usuales, que son capaces de formar con
10 iones fosfato precipitados difícilmente solubles, son alu-
minio, de preferencia como AlCl_3 o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, y además
entre las sales de metales alcalinotérreos solubles en
agua, en especial las sales de calcio solubles en agua,
tal como acetato cálcico. Para la formación del agente
15 de adsorción en la solución de inmunoglobulinas se traba-
ja convenientemente con un ligero exceso del componente
catiónico.

Si se combina la sulfitólisis con una etapa de
adsorción en el sentido de las manifestaciones preceden-
20 tes, se puede llevar la fijación de complemento de los pre-
parados de inmunoglobulinas a valores especialmente bajos,
con frecuencia próximos a 0. Sin embargo, cada etapa es
de por sí adecuada para reducir la fijación de complemen-
to de los preparados de inmunoglobulinas.

25 Puesto que la meta del procedimiento consiste en

1 reducir la fijación de complemento, las etapas del procedimiento se acoplan en lo posible entre sí de modo que los productos obtenibles por el procedimiento según la invención respondan a este requisito.

5 Corresponde a la idea de la invención que el procedimiento se lleve a cabo en condiciones que el especialista reconozca como especialmente adecuadas a este respecto. Es decir, que una combinación de concentraciones elevadas de los agentes sulfitolíticos en relación con una
10 concentración baja de proteínas, una temperatura baja y un tiempo de reacción corto han de ser coordinados en el marco descrito, y viceversa.

 La determinación del efecto anticomplementario se realiza en un ensayo de hemólisis con eritrocitos sensibilizados de carnero y con suero de cobaya (complemento).
15 En tal caso los eritrocitos y el complemento se hacen reaccionar con el preparado de inmunoglobulinas. Después de un adecuado tiempo de incubación se puede apreciar que el preparado de inmunoglobulinas, incluso en concentraciones
20 elevadas, no perjudica prácticamente a la hemólisis, lo -- que es determinable cuantitativamente por un método fotométrico. Además se puede comprobar en un ensayo "in vivo" en un conejo, que después de administración intravenosa -- del preparado de inmunoglobulinas según la invención, no
25 es apreciable ninguna inactivación del factor de complemento

1 to Cl.

5 En una serie de preparados realizados según la invención, la fijación de complemento es en conjunto inferior a 10 %, referido a un patrón tomado como 100 %. Incluso después de un almacenamiento del preparado de unos dos años, este valor sólo se modifica hacia arriba de modo no esencial. Las proporciones de aglomerados de los preparados de inmunoglobulinas son asimismo inferiores a 10 %. En una solución de proteínas al 5 por ciento, en el
10 caso de empleo de CuSO_4 , son reconocibles iones cúpricos en un orden de magnitud $< 1 \mu\text{g/ml}$.

15 El nuevo preparado de gamma-globulina, reducido en su actividad anticomplemento, contiene en lo esencial inmunoglobulina 7 S no modificada, en comparación con los preparados modificados según el estado actual de la técnica, con valores de sedimentación en parte inferiores. La actividad anticuerpo de la molécula permanece inalterada.

20 Los preparados de inmunoglobulinas obtenibles según la invención están pensados en primer lugar para la administración intravenosa. Por lo tanto, es también objeto de la invención un medicamento administrable por vía intravenosa, que contiene los preparados de inmunoglobulinas producidos según la invención, en una forma galénica adecuada. Las inmunoglobulinas débilmente tratadas sulfitolíticamente y a continuación purificadas, como se ha des
25

1 crito, después de la filtración en medio estéril habitual
pueden ser envasadas, para su consumo, en una cantidad --
cualquiera. Si se prevé emplear el preparado como solu-
ción de proteínas al 5 hasta 16 por ciento, es posible --
5 sin más un ajuste correspondiente de la solución purifica-
da y filtrada en medio estéril. Una solución que contie-
ne 0,3 - 0,9 % de una sal neutra, a la que si se desea se
le pueden añadir además otros aditivos fisiológicamente
compatibles, por ejemplo un alfa-aminoácido tal como gli-
10 cina en 1,5 - 2,5 %, se puede liofilizar, conservar como
producto liofilizado, y antes de su empleo se puede recons-
tituir como solución, por adición de la cantidad deseada
de agua destilada. Tampoco esta solución manifiesta nin-
guna fijación elevada de complemento. El agente reconsti-
15 tuído es igualmente administrable por vía intravenosa.

La invención se ilustra más detalladamente en
los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1

La fracción de gamma-globulina resultante en el fracciona-
20 miento de albúmina según Cohn, con ayuda de etanol, se di-
suelve en una solución de sal común al 0,3 por ciento, em-
pleándose por 1 kg de pasta de gamma-globulina 10 litros
de solución de sal común. La temperatura se mantiene a --
unos 5°C. Se añade a la solución 0,07 % (peso/volumen) de
25 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en forma de una solución de disulfito sódico al

04117

1 10 por ciento, y 0,007 % (peso/volumen) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
en forma de una solución de sulfato de cobre al 1 por cien-
to. Después de realizada la adición se agregan, por litro
de solución, 200 ml de una solución 0,2 molar de AlCl_3 y
5 200 ml de una solución 0,2 molar de Na_3PO_4 . La adición se
realiza con control del pH, que debe garantizar un valor
de pH de aproximadamente 5. La solución se agita durante
la noche a 5°C . Después el adsorbente de fosfato de alu-
minio se separa por centrifugación.

10 La solución que contiene las inmunoglobulinas
se precipita por adición de 25 % (volumen/volumen) de eta-
nol. El precipitado se obtiene por centrifugación. Se
disuelve en una cantidad suficiente de agua destilada, se
le añaden 0,2 % de ácido etilendiamino-tetraacético, y se
15 ajusta el valor del pH a 7,0. Por adición de 25 % de eta-
nol se precipitan de nuevo las inmunoglobulinas, se centri-
fuga, y el precipitado se disuelve en una cantidad sufi-
ciente de solución de sal común al 0,85 %. A esta solu-
ción se le añade 2,5 % (peso/volumen) de glicina. Después
20 el preparado se liofiliza.

El acabado final de la inmunoglobulina adminis-
trable por vía intravenosa se realiza del modo siguiente:
el liofilizado se disuelve en agua destilada, se lleva a
un contenido de proteínas de 5 %, se envasa en recipientes
25 finales y se liofiliza de nuevo.

1 Ejemplo 2

La fracción de gamma-globulina resultante en el fraccionamiento de albúmina según Cohn, con ayuda de etanol, se disuelve en una solución al 0,3 por ciento de sal común, em
5 pleándose 10 litros de solución de sal común por 1 kg de pasta de gammaglobulina. La temperatura se mantiene a -- unos 5°C. Se añade a la solución 0,2 % (peso/volumen) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en forma de una solución de disulfito sódico al 10 por ciento, y a continuación 0,02 % (peso/volumen) de
10 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en forma de una solución al 1 por ciento de sulfato de cobre. Al término de las adiciones se agregan con agitación, por litro de solución, 120 ml de una solución 1 molar de acetato cálcico y 120 ml de una solución 1/3 molar de fosfato secundario de sodio. El valor del
15 pH se mantiene a $8 \pm 0,1$ con lejía de sosa 0,1 M. La carga se agita durante 20 horas a 5°C. Después de este tiempo, el fosfato cálcico formado se separa por filtración y se obtiene la solución de inmunoglobulina filtrada.

El tratamiento posterior de las inmunoglobulinas
20 se lleva a cabo de modo correspondiente al del ejemplo 1.

25

04117

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la preparación de preparados de inmunoglobulinas con una actividad de complemento reducida, caracterizado porque una fracción de inmunoglobulinas se trata con una baja concentración de un agente sulfitolítico y/o con un fosfato poco soluble en agua.

15

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la fracción de inmunoglobulinas se trata con >0 pero $<5 \cdot 10^{-2}$ moles/litro de un agente sulfitolítico.

20

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque como agente sulfitolítico se emplea disulfito.

25

4ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª - 3ª, caracterizado porque la sulfitólisis se lleva a cabo en presencia de iones de metales pesados.

5ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª - 4ª, caracterizado porque los iones de metales

1 pesados se emplean en una concentración de >0 pero --
 $< 5 \cdot 10^{-3}$ moles/litro.

5 6a.- Procedimiento según la reivindicación 5a,
caracterizado porque como iones de metales pesados se em-
plean iones de cobre divalente.

7a.- Procedimiento según la reivindicación 1a,
caracterizado porque la fracción de inmunoglobulinas con-
tiene, junto a inmunoglobulinas, aproximadamente 20 - 60 %
de otras proteínas de plasma.

10 8a.- Procedimiento según la reivindicación 7a,
caracterizado porque una fracción de inmunoglobulinas con-
sistente en 40 - 80 % de inmunoglobulina y 20 - 60 % de
otras proteínas de plasma, se trata, en una concentración
de 1 - 5 % de proteínas, durante 5 - 90 horas, con 2 - 4 .
15 10^{-3} moles/litro de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 2 - 4 . 10^{-4} moles/litro de
 CuSO_4 , a pH 5 a 8, y después se separan las proteínas, --
eventualmente con enriquecimiento y purificación de las
inmunoglobulinas.

20 9a.- Procedimiento según una de las reivindica-
ciones 1a y 7a, caracterizado porque la fracción de inmu-
noglobulinas se trata con 0,005 a 0,15 moles/litro de un
fosfato difícilmente soluble en agua, preparado en la so-
lución de inmunoglobulinas.

25 10a.- Procedimiento según la reivindicación 9a,
caracterizado porque el fosfato difícilmente soluble en

1 agua es fosfato de aluminio.

11ª.- Procedimiento según la reivindicación 9ª, caracterizado porque el fosfato difícilmente soluble en agua es fosfato de calcio.

5 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque una fracción de inmunoglobulinas tratada sulfitolíticamente, se trata con un fosfato difícilmente soluble en agua.

10 13ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PREPARADOS DE INMUNOGLOBULINAS".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

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

15 Madrid, 22 SET. 1978

P.A.

Alberto de Elizaburo
Por Poderes

JAC.