

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

20 SET. 1978

ES

NUMERO

466190

A1



ESPAÑA

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

FECHA DE PRESENTACION

20 ENL. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 258/77	32 FECHA 21 Enero. 1977	33 PAIS Dinamarca
--	----------------------------	----------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION "Procedimiento para obtener albúmina purificada"

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 Suñol

76.658 Sp. GS -/11

EX-DK

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

por VEINTE años

5. solicitada en España a favor de NORDISK INSULINLABORATORIUM, de nacionalidad danesa, domiciliada en Ved Stadion 2, DK-2820 Gentofte, Dinamarca, por "Procedimiento para obtener albúmina purificada", con prioridad de la solicitud danesa 258/77 de fecha 21 Enero 1977. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

10. La presente invención se refiere a un procedimiento para recuperar albúmina purificada por precipitación fraccionada de plasma sanguíneo. - - - - -

15. Anteriormente, se ha aislado albúmina a partir de plasma sanguíneo por precipitación fraccionada con alcoholes, tales como etanol, a bajas temperaturas, y por precipitación en disoluciones salinas, por ejemplo mediante la adición escalonada de sulfato amónico. Estos procedimientos conocidos tienen varias desventajas. Así, las precipitaciones con etanol implican cierta tendencia a desnaturalizar la proteína, con una consiguiente reducción del rendimiento, y las preci-

pitaciones salinas dan productos impuros, puesto que no se obtiene una separación neta. - - - - -

5. La memoria de la patente US 3.415.804 presenta un procedimiento de precipitación fraccionada de mezclas de proteínas en presencia de polietilenglicol (PEG), inhibiendo el polietilenglicol la dispersabilidad de las proteínas. Este procedimiento, que se ha utilizado para fraccionar plasma sanguíneo humano, ha dado varias fracciones, incluyendo una fracción de albúmina que, sin embargo, estaba contaminada con betaglobulina y otras proteínas. Así, por medio de este procedimiento conocido, no ha sido posible obtener una albúmina satisfactoriamente purificada para el uso terapéutico. - - -

10.

15. La solicitud de patente danesa 1252/75 propone aislar albúmina a partir de la sangre y de productos similares por calentamiento del líquido que contiene la albúmina en presencia de un alcohol y de sustancias estabilizantes de la albúmina. Se mencionan los caprionatos como uno de los ejemplos de las muchas sustancias estabilizantes para este fin. Sin embargo, no ha sido posible evitar totalmente las desventajas del etanol o de los alcoholes similares que desnaturalizan las proteínas. - - - - -

20.

25. Además es conocido, por una solicitud, publicada con el número 134.425, de patente danesa, preparar albúmina sometiendo una disolución de albúmina, tal como plasma de placenta o de sangre humana, a una termocoagulación en presencia

de iones de ácido caprílico a temperaturas de entre 52 y 64°C y a un valor de pH de entre 4,8 y 5,25. Con la termocoagulación, precipitan la hemoglobina, la albúmina desnaturalizada y las proteínas extrañas. La albúmina purificada permanece en la disolución de la cual puede recuperarse. - -

5.

Sin embargo, este procedimiento conocido da un producto más bien impuro. La pureza puede mejorarse realizando una precipitación fraccionada antes de la termocoagulación, por ejemplo con ácido tricloroacético y etanol, pero de esta manera no puede lograrse un producto puro adecuado para el uso terapéutico. - - - - -

10.

Se conoce también una termocoagulación, por la memoria de la patente británica 739.024, pero no con respecto a una precedente precipitación con PEG. - - - - -

15.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que es posible, de manera simple y sin añadir alcoholes, combinar una precipitación fraccionada de albúmina en presencia de PEG con un tratamiento térmico en presencia de ácido caprílico como estabilizante, lo que origina una coagulación de las impurezas que de lo contrario precipitarían junto con la albúmina. Así, se obtiene un alto rendimiento de albúmina con un alto grado de pureza. - - - - -

20.

El procedimiento de la invención se caracteriza así porque se mezcla plasma sanguíneo con polietilenglicol

- (PEG) y se ajusta a un pH de 6 a 7 para la precipitación de fibrinógeno y globulinas, porque el sobrenadante con un contenido de 150 a 300 g de PEG, preferentemente de 180 a 200 g por litro de líquido, se ajusta a un pH de 4,5 a 5,3 para la precipitación de la albúmina, porque la albúmina con el PEG arrastrado se redisuelve en un medio acuoso, porque la disolución resultante de albúmina se somete a una termocoagulación a 50-65°C y a un pH de 4,6 a 5,0 en presencia de una cantidad estabilizante de ácido caprílico y porque la albúmina purificada se aísla de la disolución por precipitación. En el procedimiento en cuestión se utiliza plasma sanguíneo estabilizado al que se añade PEG en una cantidad adecuada para la precipitación, por ejemplo de 150 a 300 g por litro; el PEG 4.000 es adecuado pero pueden emplearse pesos moleculares superiores o inferiores, tales como de 1.000 a 50.000. La cantidad preferida es de 180 a 200 g de PEG por litro de líquido. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.

- La precipitación de la fracción que contiene globulinas se realiza, como se ha mencionado, a un pH de 6 a 7, pero el pH óptimo es de unos 6,7. El precipitado se separa convenientemente por centrifugación y la disolución que contiene albúmina, separada por centrifugación, se ajusta entonces a un pH de 4,5 a 5,3, preferentemente 4,9, con lo que precipita una fracción que contiene albúmina. Esta fracción contiene algunas proteínas e impurezas, así como PEG. El precipitado se redisuelve en agua, por ejemplo a una concentra
- 20.
- 25.

ción de unos 80 g/l. Entonces se añade ácido caprílico, convenientemente en una cantidad de 2 a 3 g/l, por ejemplo 2,5 g/l. La disolución se ajusta a un pH de 4,6 a 5,0, convenientemente a 4,8 y entonces se calienta a 50-65°C, preferentemente a unos 60°C, siendo un período adecuado de calentamiento el de unos 30 minutos. - - - - -

5. Por medio de este tratamiento térmico coagula, durante la precipitación, la mayor parte de las impurezas proteínicas aún presentes. Si tal tratamiento térmico se realizara a una temperatura superior a unos 55°C, sin la adición de ácido caprílico, la albúmina se descompondría y el rendimiento sería insatisfactoriamente bajo. El producto se enfría después del tratamiento térmico y el coágulo se separa por centrifugación o filtración. La albúmina purificada de la disolución centrifugada o filtrada se aísla por precipitación de una manera conocida en sí. Así puede añadirse etanol, preferentemente al 40%, y la albúmina purificada se precipita a un pH de 4,8 y por enfriamiento a una temperatura inferior a 0°C. Esta albúmina se recoge, por ejemplo por centrifugación, y se seca por congelación. - - - - -

10.

15.

20.

El procedimiento de la invención tiene la ventaja de que puede producirse, de manera simple, un producto extremadamente puro de albúmina con un alto rendimiento. Además, el procedimiento en cuestión implica otra ventaja, a saber la de que es capaz de realización industrial. En este procedimiento se evita la desnaturalización de las globulinas, lo que

25.

significa que las fracciones que contienen estas proteínas pueden tratarse adicionalmente para obtener globulinas valiosas con alto rendimiento y en estado puro. - - - - -

5. Aunque se han conocido, por separado, las precipitaciones con PEG y las termocoagulaciones, no se han realizado hasta ahora intentos de combinar estos métodos de purificación. Tal combinación posibilita el evitar la desnaturación de la albúmina lo que explica indudablemente el alto rendimiento. Sin embargo, no era posible prever que se obtuviera al mismo tiempo una pureza de producto substancialmente mejor. - - - - -

10. Aún otra ventaja del procedimiento según la invención es que se utiliza plasma sanguíneo como material de partida. Esto es posible debido a que las globulinas, como se ha mencionado, no son desnaturadas, lo que significa que pueden procesarse con alto rendimiento. - - - - -

El procedimiento de la invención se ilustrará con mayor detalle a continuación por medio de un ejemplo. - - -

Ejemplo:

20. Se mezclaron 100 l de plasma de sangre humana, estabilizado con citrato, con 137 l al 33% en peso de una disolución acuosa de polietilenglicol 3.000 para obtener 19% de PEG en la disolución. Se ajustó el valor de pH a $6,7 \pm 0,1$.

La mezcla se dejó reposar durante 45 minutos y entonces se centrifugó. El precipitado estaba compuesto por fibrinógeno y globulina. El sobrenadante contenía la albúmina. El sobrenadante albuminoso se mezcló con ácido acético hasta un pH igual a de 5,0 a 4,8. - - - - -

5.

El precipitado resultante, compuesto por albúmina, se separó por centrifugación. La albúmina se redisolvió en 80 l de agua destilada a unos 40°C y se añadieron 200 ml de ácido caprílico. Se ajustó el valor de pH a $4,8 \pm 0,1$ con una disolución de NaOH 1M en agua. La disolución se calentó a $60 \pm 0,5$ °C durante 30 minutos. El precipitado resultante se separó por centrifugación. La disolución centrifugada se precipitó con etanol frío (40% de etanol, -5°C, pH = 4,8).

10.

La albúmina precipitada se separó por centrifugación y se secó por congelación. Después de redissolver en agua destilada, de añadir ácido caprílico 0,04 M y de ajustar el pH a $7,0 \pm 0,4$, la disolución se envasó, se trató térmicamente a 60°C durante 10 horas y entonces resultó adecuada para el uso terapéutico. El contenido de sustancias de alto peso molecular, es decir la fracción que tenía un peso molecular superior a 200.000 g/mol, era menor del 0,1% de la cantidad total de proteínas. El rendimiento de albúmina es de unos 90% de la albúmina contenida en el plasma. - - -

15.

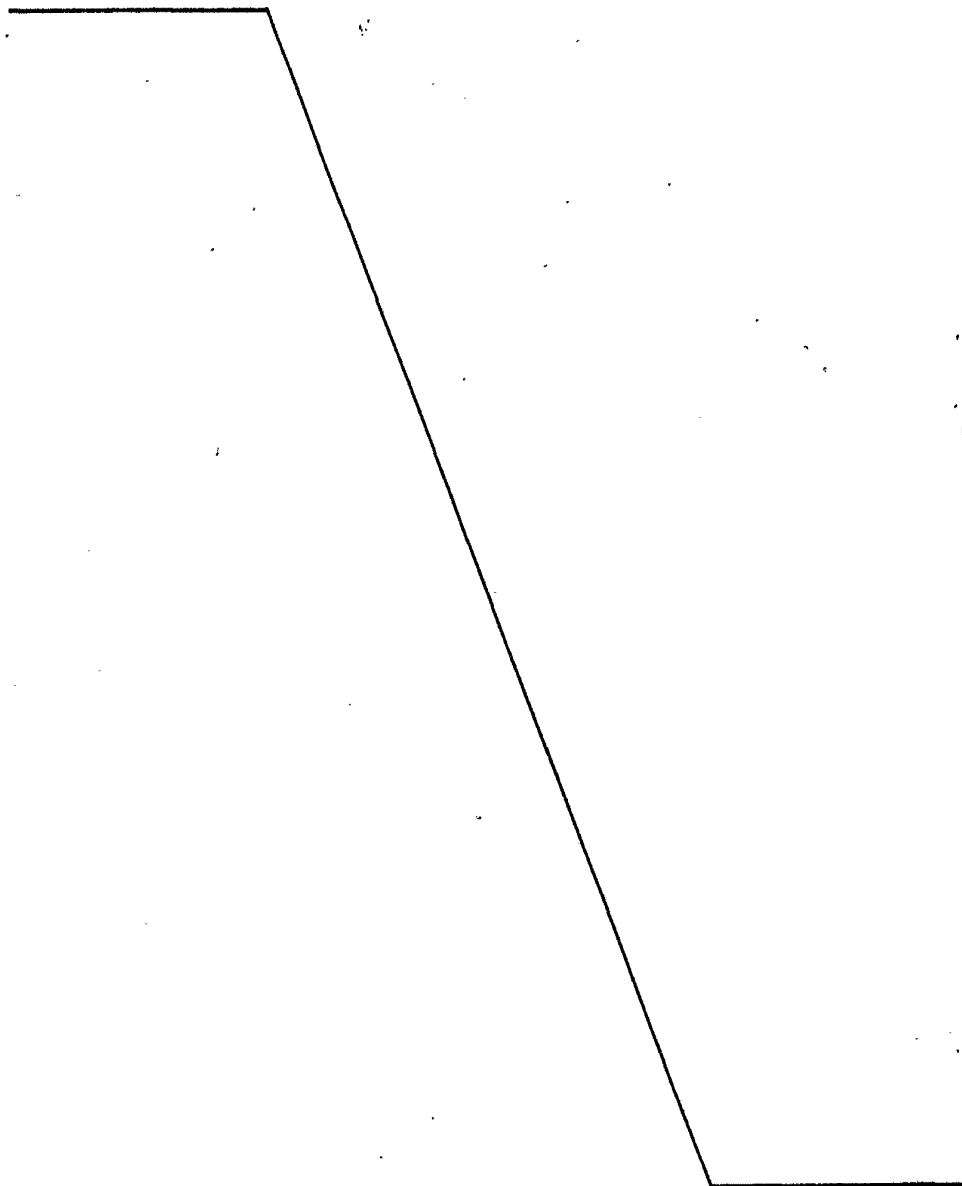
20.

Una exploración de la albúmina por medio de una electroforésis con poliacrilamida seca demostró una pureza

25.

no inferior a 99,5%. - - - - -

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

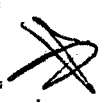


REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para obtener albúmina purificada, por precipitación fraccionada de plasma sanguíneo a fin de obtener una fracción que contiene albúmina, que se redisuelve en agua y se somete a una termocoagulación en una disolución acuosa en presencia de una cantidad estabilizante de ácido caprílico, caracterizado porque se incorporan conjuntamente el plasma sanguíneo con polietilenglicol (PEG) y se ajusta a un pH de 6 a 7 para la precipitación de fibrinógeno y globulinas, porque el sobrenadante con un contenido de 150 a 300 g de PEG, preferentemente de 180 a 200 g por litro de líquido, se ajusta a un pH de 4,5 a 5,3 para la precipitación de la albúmina, porque la albúmina con el PEG arrastrado se redisuelve en un medio acuoso, porque la disolución resultante de albúmina se somete a una termocoagulación a 50-65°C y a un pH de 4,6 a 5,0 en presencia de una cantidad estabilizante de ácido caprílico y porque la albúmina purificada se aísla de la disolución por precipitación. - - - - -

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido caprílico se utiliza en una cantidad de 2 a 3 g de ácido caprílico por litro de disolución de albúmina durante la termocoagulación. - - - - -

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque después de la termocoagulación, la separación del coágulo y el enfriamiento, la disolución de albúmina se



mezcla con un alcohol inferior, preferentemente etanol, para precipitar la albúmina purificada. - - - - -

4.- "PROCEDIMIENTO PARA OBTENER ALBUMINA PURIFICADA". - - - - -

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

MADRID 20 ENE. 1978

P. A. M. CURELL SUÑOL

Curell

~~X~~