

AÑO 1959

Expediente núm.



249137

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por VEINTE años, en España

a favor de

PAUL ARNOR OWREN, de nacionalidad
noruega domiciliado en Blommenholm, Beirum, No-
~~xxxx~~ ~~xxxx~~ ~~xxxx~~

por:

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN REACTIVO
PARA SU USO EN EL CONTROL DE LA COAGULABILIDAD DE LA
SANGRE"

Nº 14451

Agente Sr. ELZABURU

249137

F - 18.202

- 1 SEP. 1959

249137

Nº 9027

Rehecha I



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de PAUL AMOR OWREN, de nacionalidad noruega, residente en Blommenholm, Bærum, Noruega, por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE REACTIVOS PARA SU USO EN EL CONTROL DE LA COAGULABILIDAD DE LA SANGRE"

Los anticoagulantes orales (dicumarol y derivados del dicumarol, fenilindanodiona y sustancias análogas) provocan una reducción de la coagulabilidad de la sangre y se utilizan en la actualidad extensamente en el tratamiento de estados trombóticos. La profilaxis contra la trombosis en las enfermedades arterio-escleróticas (infarto coronario, angina de pecho, trombosis arterial periférica y cerebral) se adopta cada vez más en general.

El tratamiento anticoagulante eficaz exige un control regular de la coagulabilidad de la sangre. Es necesario ajustar la

249137

15



dosificación al caso individual para evitar, por una parte, las cantidades excesivas que podrían dar lugar a complicaciones en hemorragias y, por otra parte, dosificaciones demasiado pequeñas que dejarían de ser eficaces.

5 Mediante las técnicas descritas anteriormente para este control, no ha sido posible en cada caso individual determinar la coagulabilidad de la sangre con suficiente exactitud de modo que se resuelvan estas dificultades de dosificación. Existe, por lo tanto, una necesidad grande de métodos que hagan posible un control exacto.

10 Por medio del reactivo que comprende el presente invento, este problema se ha resuelto de un modo satisfactorio, según se deducirá de la siguiente descripción del invento.

15 Con objeto de hacer más fácil de comprender el invento, se indicará primeramente la acción de los agentes anticoagulantes.

20 La coagulación de la sangre se efectúa por medio de dos sistemas de coagulación separados en parte: el sistema externo y el interno. Los agentes anticoagulantes por vía oral provocan un descenso en la concentración de los siguientes cuatro factores de coagulación en la sangre: protrombina, factor Stuart, proconvertina y factor anti-hemofilia-B. De estos factores, la protrombina y el factor Stuart se hallan comprendidos en ambos sistemas: la proconvertina actúa solamente en el sistema externo; y el factor anti-hemofilia-B participa solamente en el sistema interno. Esto se representa en el esquema siguiente:



249137

Sistemas de coagulación de la sangre

El sistema "interno"

El sistema "externo"

5 ("Periodo de cefalina")

("Periodo de tromboplastina")

Factor 3 de plaquetas de sangre
("Cefalina")

Tromboplastina de tejido

10 Factor antihemofilia-A (A.H.G.)

Proconvertina

Factor antihemofilia-B (P.T.C.)

Factor antihemofilia-C (P.T.A.)

Factor "Hageman"

15 Factor "Stuart"

Protrombina

Froacelerina

Fibrinógeno

20 Hasta ahora no existía ningún método que hiciera posible la determinación cuantitativa del efecto total de la reducción de los cuatro factores especificados sobre el proceso total de coagulación, esto es, sobre los sistemas interno y externo. Los métodos que se han utilizado hasta ahora, es decir, el método de Quick y el llamado método P-P, son solamente
25 sensibles a los cambios en el sistema de coagulación externo. Por tanto, si se aplican al control del tratamiento anticoagulante reflejan la reducción de proconvertina, factor de Stuart y protrombina; la reducción del factor anti-hemofilia-B no se
30 registra de ningún modo por el método de Quick y sólo en muy

249137 - 1 SEP



pequeña extensión por el método P-P.

La figura 1 adjunta representa la sensibilidad de estos tres métodos con cantidades decrecientes del factor anti-hemofilia-B. En abcisas se representa la "concentración" del factor anti-hemofilia-B relativa a los otros factores como porcentaje del valor normal. En ordenadas se indica el tiempo de coagulación en segundos (20 a 160) segundos.

El estudio se realizó mezclando hemofilia-B-plasma y plasma normal en diversas proporciones.

La curva A representa la sensibilidad del nuevo método a cantidades en disminución del factor anti-hemofilia-B.

La curva B representa la sensibilidad del método P-P y la curva C representa la sensibilidad del método de Quick a cantidades en disminución del factor anti-hemofilia-B.

La explicación de las diferencias observadas en las curvas representadas en la figura es que en el método P-P y en el método de Quick se añade a la sangre o plasma a examinar una tromboplastina de tejido muy activa.

En el método de Quick se utiliza un extracto de cerebro de conejo y en el método de P-P un extracto de cerebro humano. Estas tromboplastinas muy activas hacen que la coagulación tenga lugar exclusivamente a través del sistema externo de coagulación, ya que la coagulación en este sistema es tan rápida que acaba mucho antes de que se active totalmente el sistema interno. Por tanto, el tiempo normal de coagulación de un plasma después de la adición de una tromboplastina activa, como en el método de Quick, es solo de 12-13 segundos, mientras que el sistema interno, incluso después de la adición de concentraciones óptimas de cefalina, exige por lo menos 50 segundos para dar lugar a la formación de trombina que a su vez coagula el



248137

- 1 SE

fibrinógeno. La adición de dichas tromboplastinas activas enmas-
 cara completamente el sistema interno. Con el método de Quick,
 el período de coagulación (que se designa frecuentemente como
 "el período de protrombina" o "el período de tromboplastina")
 es, por consiguiente, perfectamente normal, incluso cuando hay
 ausencia completa del factor anti-hemofilia-B (véase figura 1).

Debe hacerse observar que se han desarrollado métodos
 para el control del sistema interno de coagulaciones, utilizan-
 do cefalina en lugar de tromboplastina. Estos métodos, depen-
 diendo de los detalles del sistema, pueden utilizarse para la
 determinación de los distintos factores anti-hemofilicos. Sin
 embargo, los métodos de este tipo no se emplean nunca para el
 control del tratamiento anticoagulante por dos razones princi-
 pales. En primer lugar, dicho "períodos de cefalina" son muy
 sensibles a una serie de efectos incidentales; en segundo lu-
 gar, se hallan desde luego totalmente inafectados por los cam-
 bios en el sistema externo de coagulación, de los que las va-
 riaciones en la concentración de proconvertina pueden ser los
 más importantes.

El presente invento proporciona un método que permite
 al médico determinar simultáneamente la coagulabilidad de la
 sangre en los sistemas externos e interno con un solo ensayo.
 Mediante el nuevo reactivo, los sistemas de coagulación exter-
 no e interno actúan simultáneamente y de tal modo que tienen
 lugar aproximadamente con la misma velocidad, resultando que
 ambos sistemas ejercen aproximadamente las mismas influencias
 sobre el período de coagulación del sistema.

Métodos previos para el control del tratamiento anticoagulante

Según se indicó, se han utilizado hasta ahora dos méto-

249137

- 1 SEP 6



dos principales para el control del tratamiento anticoagulante: 1) el método de Quick, 2) el método P-P.

Método de Quick. (Quick, A.J.: Biol. Chem. J.109, lxxxiii (1935))

5 El método de Quick se propuso originalmente como método de determinación de la protrombina de la sangre; en aquella época los factores proconvertino, factor de Stuart y proacelerina eran desconocidos. En este método, las concentraciones de calcio y de tromboplastina se mantienen constantes.

10 El método ha sufrido pequeños cambios. La última descripción detallada es la siguiente: Quick, A.J.: Hemorrhagic diseases, Lea and Febiger, Filadelfia 1957, pag. 379-387.

Reactivos:

15 1. Suspensión de tromboplastina: extracto de cerebro de conejo desecado con acetona.

2. Solución de cloruro cálcico 0,01N.

20 Procedimiento: 0,1 ml de plasma oxalatado se mezclan con 0,1 ml de solución de tromboplastina colocada en baño maría a 37° C y recalcificada con 0,1 ml de solución de cloruro cálcico 0,01N y se determina el tiempo de coagulación o el "periodo de tromboplastina" (llamado también periodo de la protrombina de Quick).

25 Comentario: El método es sensible solamente al sistema de coagulación externo (véase el esquema de la pág. 2). El sistema de coagulación interno, según se indicó anteriormente, no tiene oportunidad de influir en el tiempo de coagulación.

30 La tromboplastina y el calcio son los únicos factores que se mantienen constantes en el método de Quick. Una alteración en cualquiera de los otros factores del sistema externo: protrombina, proconvertina, factor de Stuart, proacelerina-

249137



na o fibrinógeno sería capaz, sin embargo, de afectar al "pe-
riodo de tromboplastina" de Quick registrado. Durante el trata-
miento anticoagulante es probable que la proacelerina y el fi-
brinógeno sean relativamente constante; de aquí que una prolon-
gación del "periodo de tromboplastina" de Quick será debido a la
5 reducción de: proconvertina, factor de Stuart, y/o protrombina.
Por otra parte, el método es totalmente insensible a una reduc-
ción del factor anti-hemofilia-B. En la hemofilia-B el "periodo
de tromboplastina" de Quick es normal (véase fig. 1). Por tanto,
10 si este método se utiliza para el control de la dosificación
del tratamiento anticoagulante, se corre el riesgo, de que ten-
ga lugar hemorragia debido a una reducción particularmente gran-
de del factor anti-hemofilia-B, ya que una alteración semejante
no sería revelada por este método. Mediante la determinación
15 cuantitativa específica de los diversos factores que entran en
juego, hemos descubierto que el factor anti-hemofilia-B se re-
duce a menudo de modo más marcado que los otros factores, según
puede observarse en la fig. 2 adjunta. Estos resultados son para
la fenilindanodiona, si bien el dicumarol y los derivados de
20 dicumarol tienen prácticamente el mismo efecto.

En las abscisas, los números 8-30 indican las fechas en
Marzo de 1957 cuando se realizaron los ensayos. Los ensayos se
terminaron el 2 de Abril de 1957.

En ordenadas se indican porcentajes (estos desde luego
25 no son absolutos, significando 100% la "concentración" normal)
de protrombina, proconvertina y factor anti-hemofilia-B concen-
trados en la sangre en las fechas indicadas por análisis rea-
lizados durante esta investigación.

La curva D representa el porcentaje de protrombina cen-
30 centrado en la sangre,

249137 - 1



La curva E, el porcentaje de proconvertina y la curva F el porcentaje del factor anti-hemofilia-B.

5 Como puede observarse, el nivel de los tres factores indicados fué aproximadamente del 100% al principio de los ensayos. El 9 de Marzo de 1957, se comenzó con el agente anti-coagulante fenilindanodiona en dosis diarias, pudiendo observarse la cantidad del mismo a la zona de la parte superior de la figura. A la izquierda de este área, la línea vertical representa 100 mg de fenilindanodiona. La cantidad de cada dosis
10 diaria aparece en la línea vertical dibujada desde la fecha en cuestión en la abcisa. El 25 de Marzo se detuvo la administración del anticoagulante y el contenido en % de los factores ascendió entonces rápidamente.

15 El hecho de que el método de Quick no sea sensible a la reducción del factor anti-hemofilia-B se cree que es una de las causas de la reacción relativamente grande de complicaciones hemorrágicas cuando se utiliza el método de Quick para el control del tratamiento anticoagulante.

20 Entre otros defectos de este método, pueden mencionarse los hechos de que es insensible a las variaciones de los tres factores en el intervalo de 50 a 100% del normal, de que la concentración de calcio empleada no es óptima si el valor hematocrítico de la sangre es anormal, y que el "periodo de tromboplastina" se afecta por la concentración de proacelerina
25 en el plasma examinado. La proacelerina es inestable y se inactiva durante la conservación del plasma oxalatado; por este motivo, el método precisa una muestra de sangre relativamente reciente.

30 2. El método P-P (método protrombina-proconvertina)
Owren, P.A.: The Coagulation of Blood, Acta Med. Scand. 128

249137



(suppl.) 194) p.327 (1947), Owren, P.A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1, 81-83 (1949), Owren, P.A. and Aas, K.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 3, 201-208 (1951).

Reactivos:

1. Suspensión de tromboplastina: extracto acuoso de cerebro humano.
2. Plasma bovino adsorbido.
3. Solución de cloruro cálcico de concentración óptima (normalmente 0,025N).

Procedimiento: 0,2 ml de plasma bovino adsorbido se mezcla con 0,2 ml de suspensión de tromboplastina y 0,2 ml de una dilución 1:10 del plasma a investigar; la mezcla se coloca en un baño maria a 37°C. Se toma el tiempo de coagulación (periodo P-P) después de recalcificación con 0,2 ml de solución de cloruro cálcico.

Comentario: como en el caso del método de Quick, el método P-P es una determinación del "periodo de tromboplastina" es decir, es principalmente un método para determinar la actividad del sistema de coagulación externo. Las diferencias principales entre el método P-P y el método de Quick son las siguientes:

1. Se introduce un nuevo reactivo, el plasma bovino adsorbido, con objeto de estabilizar las concentraciones de proacelerina y fibrinógeno. La determinación es, por tanto, independiente de la concentración de estos factores en el plasma ensayado. Puesto que los factores que se reducen durante el tratamiento anticoagulante son relativamente estables durante la conservación de la sangre y plasma. el método puede utilizarse en muestras almacenadas.

- 2* Se utiliza una dilución al 10% del plasma de ensa-

249137

- 15



5 yo. Esto aumenta la sensibilidad del método, especialmente en el intervalo 50-100%. La dilución del plasma de ensayo tiene asimismo la ventaja de que el peligro de una concentración de calcio no óptima al variar los valores hematocritos es mucho menor que en el método de Quick. La dilución elimina asimismo el efecto de pequeñas cantidades de heparina en el plasma a examinar.

10 Como en el caso del método de Quick, el método P-P es sensible a las reducciones de protrombina, factor de Stuart y proconvertina. (Gonyea, L.M., Hjort, P., Owren, P.A.: The Journal of Laboratory & Clinical Medicine, 48, 624-633 (1956)).

15 La tromboplastina utilizada en el método P-P (extracto acuoso de cerebro humano) ejerce, junto a su efecto tromboplástico, un efecto de cefalina sobre el sistema interno de coagulación. Sin embargo, este efecto no es óptimo. Como resultado de este efecto de cefalina y de la dilución del plasma de ensayo, puede demostrarse que el método P-P posee una determinada sensibilidad, aunque extraordinariamente pequeña, a las reducciones excesivas del factor anti-hemofilia-B, si el sistema externo de coagulación está deteriorado grandemente después del tratamiento
20 anticoagulante (véase fig. 1) (Wealer, B.A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, 322-330 (1957)). Desde el punto de vista de la práctica clínica, esta sensibilidad del método P-P a las reducciones del factor anti-hemofilia-B es demasiado pequeña para permitir que dé alguna protección frente a las complicaciones hemorrágicas debidas a un descenso grande del factor anti-hemofilia-B.
25

30 De vez en cuando se han propuesto otras modificaciones del método de Quick, como por ejemplo el empleo de otras preparaciones de tromboplastina -procedente de pulmones de conejo y cerebro humano, unas en forma seca con acetona y otras en forma seca por congelación. Se han utilizado asimismo diluciones del

249137



1955

5 plasma a investigar con objeto de aumentar la sensibilidad del método, especialmente en el intervalo de 50-100%. La variación de la concentración de calcio relativa al valor hematocrítico de la sangre ha sido asimismo propuesta con objeto de asegurar la re-calcificación óptima. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones ha alterado el principio del método y ninguna ha supuesto un cambio en la sensibilidad defectuosa del método a la reducción del factor antihemofilia-B.

10 Los reactivos para el método P-P-el plasma bovino adsorbido y la suspensión de tromboplastina- se han obtenido en forma seca por congelación. Sin embargo, este cambio no altera, desde luego, la falta de sensibilidad del método a la reducción del factor antihemofilia-B.

15 Método para el control de la coagulabilidad de la sangre durante el
tratamiento anticoagulante

20 De lo anterior se deducirá que ninguno de los métodos descritos hasta ahora ha sido satisfactorio para el control del tratamiento anticoagulante.

La información que sigue describe el invento: una preparación que permite el control satisfactorio de este tratamiento.

25 Este procedimiento se basa en un principio completamente nuevo, a saber, que se realiza una determinación simultánea y combinada de la actividad en el sistema de coagulación interno y externo. Hasta ahora, no disponíamos de ningún método para dicha determinación combinada; los dos sistemas de coagulación se han investigado siempre separadamente.

30 El método se basa en un reactivo que inicia ambos sistemas de coagulación simultáneamente y de tal manera que ambos requieren

249137



aproximadamente el mismo tiempo. Para llegar a esta situación, el sistema de coagulación interno se sitúa en las condiciones óptimas para una velocidad máxima incluyendo "cefalina" del cerebro humano o una cefalina similar que tenga la misma actividad, en el reactivo en concentración óptima. El sistema de coagulación interna solo, producirá la coagulación completa en estas condiciones en unos 50 segundos.

Al mismo tiempo, el reactivo contiene una tromboplastina que inicia el sistema externo de coagulación, si bien esta tromboplastina es de tal naturaleza que en la concentración óptima tiene una actividad baja pero constante. Como resultado de este, la velocidad del sistema externo de coagulación se reduce considerablemente en comparación con la velocidad normal obtenida con las preparaciones de tromboplastina activa del tipo utilizado en el método de Quick y en el método P-P. La tromboplastina utilizada en este método debe dar en la concentración óptima un periodo de tromboplastina con plasma normal de 35-50 segundos.

Teóricamente, una tromboplastina débil podría obtenerse por dilución de una tromboplastina activa (del tipo empleado en el método de Quick y en el método P-P), pero este procedimiento da lugar a un reactivo labil y prácticamente inútil, porque pequeños cambios en su actividad producen oscilaciones considerables en los tiempos registrados. El reactivo emplea, por tanto, una tromboplastina que tenga una actividad estable y baja en concentración óptima y que tenga un margen relativamente amplio de concentraciones óptimas.

Como material de partida para la producción de una tromboplastina semejante, se utilizan órganos de determinadas especies de animales. La tromboplastina producida es específica para la especie y reacciona solo lentamente con la proconvertina humana. Las tromboplastinas de cerebro de buey, cerdo y caballo po-

249137-1 SEP.



seen estas características.

5 Se ha encontrado que la combinación en un reactivo de una tromboplastina que tenga una actividad débil frente al plasma humano y de cefalina humana (o sustituto de cefalina), ambas en concentración óptima da lugar a que los sistemas interno y externo de coagulación tengan, aproximadamente, la misma influencia en el período de coagulación. Este método es, por lo tanto, sensible a las reducciones del factor antihemofilia-B en el sistema interno y de la proconvertina en el sistema externo, además, desde luego, del factor Stuart y de la pretrombina, que participan en ambos sistemas.

10 La figura 1 representa la marcada sensibilidad de este método para reducciones elevadas del factor antihemofilia-B en contraste con la sensibilidad muy escasa del método de Quick y la sensibilidad muy débil del método P-P.

15 Se deduce de esto que las principales desventajas de los métodos y reactivos empleados hasta ahora (método de Quick, método de P-P) se han eliminado en todos sus aspectos esenciales.

20 El invento se basa, además, en el concepto de que los períodos de coagulación determinados deben ser independientes de los cambios en todos los factores de coagulación que no son afectados por el tratamiento anticoagulante. Esto se consigue mediante la inclusión en el reactivo de todos estos factores en concentración elevada y constante. Con este objeto, se utiliza un plasma de buey especialmente adsorbido, preparado análogamente al del método P-P. Este plasma bovino adsorbido contiene concentraciones elevadas de factor antihemofilia-A, factor antihemofilia-C y factor de Hageman (del sistema interno) y de proacelerina y fibrinógeno (que participa de ambos sistemas). Se prepara, además, de tal modo que no contenga cantidades perceptibles de: proconvertina, fac-

249137



tor antihemofilia-B, factor de Stuart o protrombina, precisamente los cuatro factores que se reducen durante el tratamiento anticoagulante.

5 Como resultado de esto, el reactivo es específico y sensible a los cuatro factores que se reducen durante el tratamiento anticoagulante y, al mismo tiempo, no tienen influencia sobre
10 el las variaciones de los otros factores de coagulación. Los periodos de coagulación que se registran mediante este método proporcionan, por tanto, un índice adecuado del efecto total que tienen los agentes anticoagulantes sobre la coagulación de la sangre. La diferencia decisiva con los métodos anteriores, es según se indicó, la sensibilidad del nuevo método a la reducción de la concentración del factor antihemofilia-B.

15 Composición del reactivo:

El nuevo reactivo contiene pues los siguientes componentes:

20 1. Tromboplastina. Esta tromboplastina tiene una actividad baja en la concentración óptima y da lugar a un "periodo de tromboplastina" con plasma normal de 35-50 segundos. La tromboplastina se prepara a partir de órganos animales que, debido a su especificidad para la especie, tiene una reactividad baja con la preconvertina humana. Son ejemplos la de buey, caballo y cerdo.

25 2. Cefalina. Esta cefalina se caracteriza por una reactividad elevada frente al plasma humano. Puede obtenerse del cerebro humano, aunque pueden utilizarse otras preparaciones de cefalina-lecitina que tengan reactividad elevada frente al plasma humano, por ejemplo, una preparación de lecitina de soja (ejemplo: Aselectin comercial procedente de Associated Concentrates

30



249137 - 1 SEP

Inc., 57-01, 32nd Avenue, Woodside, Nueva York).

5 3. Plasma de buey adsorbido. Este se prepara de tal manera que contenga una concentración elevada y constante de todos los factores de coagulación que no sean afectados por un tratamiento anticoagulante, mientras que, al mismo tiempo, no contiene cantidades perceptibles de los cuatro siguientes factores: protrombina, factor de Stuart, proconvertina y factor antihemofilia-B.

10 4. Cloruro cálcico. Se añade cloruro cálcico al reactivo en una cantidad que dé la concentración óptima para la coagulación después de adición del plasma de ensayo.

Los cuatro ingrediente indicados se mezclan dando un reactivo.

15 La naturaleza del reactivo es tal que es estable en solución y presenta una reactividad inalterada incluso después de conservado a temperatura ambiente durante 12 horas. Esta estabilidad se obtiene, entre otras cosas, por la eliminación total que se ha conseguido de los cuatro factores de coagulación anteriormente indicados. Anteriormente, había sido posible, desde luego, 20 mezclar la tromboplastina y el calcio en un reactivo, pero un reactivo estable no había sido posible anteriormente después de la recalcificación de un plasma adsorbido con o sin tromboplastina.

25 El reactivo "combinado" se prepara en forma seca por congelación en ampollas para la distribución. Se han determinado mediante estudios las condiciones óptimas para la estabilidad de la preparación seca; en particular, la concentración iónica, concentración de anticoagulante, etc.

30 El reactivo seco por congelación se reconstituye por adición de agua destilada en solución de cloruro cálcico a la

249137



ampolla por el método de sangre capilar t venosa respectivamente.

Estabilidad: El reactivo presenta actividad inalterada des
pués de conservar las ampollas a 47° C durante 30 días.

5

Preparación del reactivo:

En la descripción que sigue se indica la preparación del
nuevo reactivo propuesto en este invento.

10

Tromboplastina: Puede utilizarse cerebro de buey, puesto
que hemos demostrado, según se indicó anteriormente, que la trom-
boplastina del cerebro de buey presenta una reactividad lenta
frente a la proconvertina humana debido a su especificidad. En
concentración óptima, el extracto de cerebro de buey da lugar
a un periodo de tromboplastina con plasma humano normal de, apro-
ximadamente, 35 segundos. El procedimiento de preparación es aná-
logo al de la tromboplastina de cerebro humano (Owren, P.A.: J.
of Clin & Lab. Invest. 1, 81 (1949)).

15

20

Suspensión de cefalina "bruta": Esta se prepara a partir
de cerebro humano de acuerdo con el método publicado por este
Laboratorio. (Hjort, P., Rapaport, S.I. and Owren, P.A.: J. Lab.
Clin. Medicine, 46, 89-97 (1955)).

25

Las cantidades de tromboplastina y cefalina (o sustitui-
to de cefalina) se ajustan de modo que la concentración en el
reactivo final sea óptima.

30

Plasma de buey adsorbido: 1) La sangre y el plasma se
tratan de tal modo que el plasma adsorbido contenga, además del
factor antihemofilia-A, factor de Hageman, proacelerina y fibri-
nógeno, una concentración elevada del factor antihemofilia-C en
forma no activa. La importancia de esto no se había comprendido
anteriormente.

249137



2.) La adsorción se efectúa mediante $BaSO_4$ en una cantidad tal y con tratamientos repetidos hasta que los ensayos indiquen que se ha alcanzado la eliminación completa de protrombina, factor de Stuart, proconvertina y factor antihemofilia-B.

3.) Se utiliza la centrifugación extremadamente cuidadosa para la eliminación total del sulfato bórico en suspensión.

4.) Como nuevo principio en la preparación de este reactivo, se introduce la diálisis con objeto de obtener:

a) Eliminación del sistema tampón ácido carbónico-bicarbonato del plasma. Esto es necesario para el ajuste exacto y la estabilización del pH en la preparación seca acabada.

b) Eliminación de oxalato. Esta es necesaria (1) para la estabilidad de la proacelerina (2) para evitar la precipitación de oxalato cálcico con la consiguiente adsorción de factores de coagulación durante la realización del ensayo (3) para permitir el empleo de plasma al citrato para las determinaciones.

5.) Después de la diálisis, el pH se ajusta cuidadosamente (entre pH 6 y 8), de modo que se obtenga un pH óptimo y estable después de reconstituir la preparación seca. Esto tiene una importancia decisiva para mantener las propiedades del reactivo y para la solubilidad del fibrinógeno en la reconstitución.

La tromboplastina, la cefalina (o el sustituto de la cefalina) y el calcio se añaden al plasma de buey adsorbido en concentraciones tales que éstas sean óptimas para el proceso de coagulación durante la realización del ensayo.

La preparación así obtenida se seca por congelación.

Procedimiento para su empleo:

Cuando se utilice la preparación para el control de la coagulabilidad de la sangre, se emplea el siguiente procedimiento:

249137



Después de la reconstitución del reactivo en agua destilada o solución de cloruro cálcico (véase más adelante), se colocan 0,5 ml. por medio de una pipeta en un tubo de ensayo muy pequeño (8-9 mm de diámetro, 60 mm de longitud). Se añade una cantidad medida del plasma o sangre a examinar (véase más adelante) y se determina el periodo de coagulación con un cronómetro. El tiempo registrado es una expresión del efecto del tratamiento anticoagulante sobre el proceso de coagulación. El ensayo se realiza en baño maria a 37° C.

El periodo de coagulación registrado se convierte en actividad relativa, indicada en %, utilizando una curva de correlación. En la figura 3 adjunta se indican ejemplos de curvas de correlación. Estas curvas indican la relación entre los periodos de coagulación registrados en dos sistemas y la actividad de coagulación expresada en porcentaje de la normal.

La concentración de plasma normal en % se representa en escala logarítmica en la abscisa y los periodos de coagulación en segundos (30-300 segundos) se representan en la ordenada en escala logarítmica. La curva K representa el método utilizado para sangre capilar, 0,10 ml. de volumen. La curva H representa el método utilizado para sangre al citrato, 0,10 ml. de volumen, y para plasma al citrato en dilución: tres partes de plasma por dos partes de sal y 0,10 ml. de volumen.

La curva G representa otro método utilizado para el plasma al citrato en la dilución: un volumen de plasma por cuatro volúmenes de sal, y 0,20 ml de la dilución como volumen de ensayo.

El método puede utilizarse para sangre capilar (sangre total), que no contiene anticoagulante añadido y para sangre o plasma al citrato. El reactivo se provee con la concentración óptima de calcio para la sangre capilar y no puede utilizarse directamente para la sangre al citrato o plasma al citrato, pues-

249137

15



to que para estas muestras la concentración de calcio no es óptima.

5 Para la sangre y plasma al citrato, por lo tanto, el reactivo seco ha de reconstituirse con solución de cloruro cálcico 3,2mM, que compensa la cantidad de citrato en la muestra de ensayo.

1. Sangre capilar.

10 Debe hacerse una incisión en la piel, en la punta del dedo o en el lóbulo de la oreja, que sangre vivamente. 0,10 ml de sangre entera se introduce a continuación en una pipeta de modo usual, y ésta se mezcla rápidamente con 0,5 ml de reactivo que se ha colocado previamente en baño maria a 37 grados centígrados. Se determina el tiempo de coagulación.

2. Sangre al citrato.

15 Se utiliza sangre venosa mezclada con 3,13% (p/v) de solución de citrato sódico dihidrato en la relación de 1 parte de solución de citrato sódico por 9 partes de sangre. Ejemplo: 0,2 ml de solución de citrato sódico se introducen en una jeringa de 2 ml y la jeringa se llena a continuación con sangre pinchando en la vena hasta un volumen de 2 ml. La muestra se pasa a un pequeño tubo de ensayo y se toma 0,10 ml de sangre al citrato con una pipeta y se mezclan con 0,5 ml de reactivo, determinando el tiempo de coagulación de la manera descrita anteriormente.

3. Plasma al citrato.

25 La sangre al citrato se prepara del modo descrito en el párrafo 2. Después de centrifugar, se toman 0,6 ml de plasma al citrato en un pequeño tubo de ensayo y se añaden 0,4 ml de suero salino fisiológico. Después de mezclar, se separan con una pipeta 0,10 ml del plasma diluido y seguidamente se mezclan con 0,5 ml del reactivo. Se determina el tiempo de coagulación según se indicó anteriormente.

249.37

1 SEP



El nuevo reactivo "combinado" constituye un nuevo producto puesto que hace posible llevar a cabo una determinación combinada de la actividad de coagulación de los sistemas interno y externo de coagulación.

5 La preparación del reactivo está basada en principios que no se habían utilizado anteriormente. El reactivo tiene una serie de ventajas cuando se compara con reactivos anteriores.

10 (1) Es muy estable a temperatura ambiente, simplificando así la distribución y conservación. (2) Resiste el calentamiento hasta 47° C durante un mínimo de 30 días y puede utilizarse, por tanto, en regiones tropicales. (3) La necesidad de un solo reactivo hace que el procedimiento sea más sencillo y la realización del ensayo más rápida que en el caso de los métodos anteriores. (4) Es el único método desarrollado hasta ahora que pro-

15 porciona un índice adecuado de la alteración de la coagulación producida por agentes anticoagulantes orales. En contraste con los métodos anteriores, éste es sensible a la reducción del factor antihemofilia-B. (5) Como consecuencia de las propiedades anteriores, este método da una protección mucho mayor frente a

20 las complicaciones hemorrágicas que los otros métodos. (6) El método ahorra tiempo. (7) Debido a la estabilidad del reactivo en forma reconstituida, produce resultados seguros y reproducibles.

25 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Noruega el día 16 de Mayo de 1958, bajo el número 128.104 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.



NOTA

249137

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 siguientes:

5
10
15
1.ª. - Procedimiento para la preparación de reactivos para su uso en el control de la coagulabilidad de la sangre, consistente en lo siguiente: se prepara tromboplastina a partir de cerebro de buey (u otros cerebros animales) del mismo modo que se utiliza en general para la preparación de tromboplastina a partir del cerebro humano, la suspensión de cefalina se prepara a partir de cerebro humano por un método descrito anteriormente y se obtiene una preparación de plasma de buey que contiene una concentración elevada de todos los factores de coagulación que no se reducen durante el tratamiento anticoagulante; estos constituyentes se mezclan a continuación y se añade cloruro cálcico en una cantidad que produzca la concentración óptima para la coagulación después de la adición del plasma de ensayo.

20
2.ª. - Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el producto obtenido se seca por congelación.

25
3.ª. - Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que dicho plasma de buey se libera de protrombina, factor de Stuart, proconvertina y factor antihemofilia-B por adsorción repetida con sales insolubles de metales pesados, particularmente sulfato bórico, después de lo cual estas sales se separan de la suspensión por filtración o centrifugación.

30
4.ª. - Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que el plasma de buey se desliza

249137



después de la adsorción con objeto de separar el sistema tampón ácido carbónico-bicarbonato del plasma y separar el oxalato.

5a. - Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que el producto obtenido de la diálisis se ajusta a un pH entre 6 y 8

6a. - Procedimiento para la preparación de reactivos para su uso en el control de la coagulabilidad de la sangre.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, - 1 SEP. 1959

P. A.

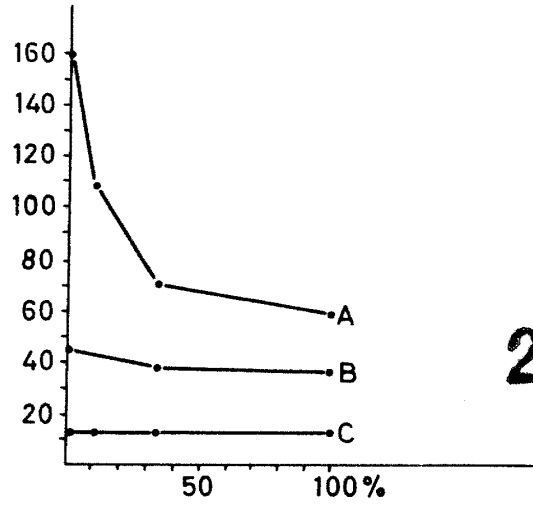
Alberto de Elzabur

For/10/59

18202



FIG. 1.



249137

249137

FIG. 2.

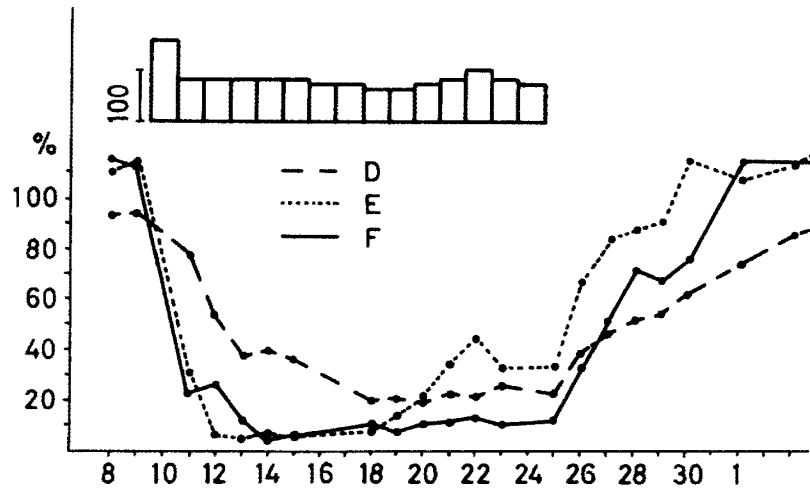
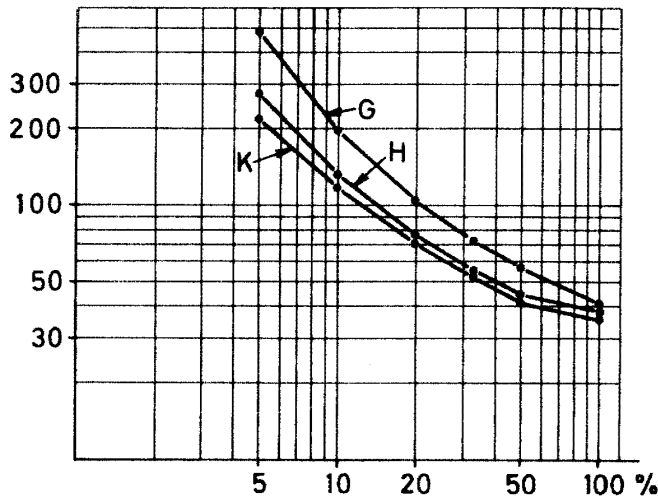


FIG. 3.



[Handwritten signature]