

12 SEP



304013

304013

PATENTE DE INTRODUCCION

por DIEZ años

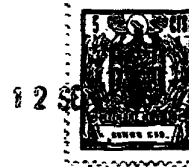
cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía,
a favor de:

D. JAIME FERRE FERRERES

de nacionalidad española, domiciliado en
Barcelona, P^o Exposición núm. 62
relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FIBRI-
NOGENO"

=====



304013

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Introducción se contrae, conforme se indica en su enunciado, a un procedimiento para la obtención de fibrinógeno, tanto partiendo de plasma humano como de plasma bovino. - - - - -

5. El fibrinógeno es la proteína del plasma la cual, por acción de diversos factores y mediante un complejo proceso, se transforma en fibrina, formando un retículo que engloba los glóbulos sanguíneos dando lugar a la coagulación de la sangre. - - - - -

10. El fibrinógeno tiene aplicación terapéutica en los casos de hipofibrinogenemia por lo que la obtención de un producto apto para uso clínico es de la mayor importancia.-

15. Mediante el procedimiento de Cohn de fraccionamiento del plasma humano con alcohol y baja temperatura, se obtienen diversas fracciones plasmáticas, entre ellas el fibrinógeno. El fibrinógeno obtenido por el método 6 de Cohn, está muy impurificado por otras proteínas plasmáticas y factores de coagulación, de manera que el porcentaje de fibrinógeno es solo del 40 al 50% sobre el total de la proteína y, además, coagula en poco tiempo, lo que limita el tiempo disponible entre la preparación de la solución y su inyección.



SEP 1922

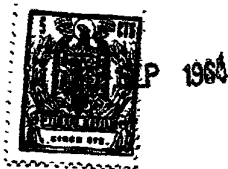
304013

En orden a evitar estos inconvenientes se ha desarrollado un procedimiento que se basa en la extracción de las impurezas manteniendo el fibrinógeno insoluble, para lo cual se emplean soluciones alcohólicas de fuerza iónica controlada, que contienen glicocola la cual, en la concentración utilizada, reduce la solubilidad del fibrinógeno mientras aumenta la solubilidad de las proteínas contaminantes. - - - - -

- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

De acuerdo con las precedentes premisas se ha desarrollado el procedimiento objeto de la presente Patente, el cual esencialmente se caracteriza por el hecho de que la masa de plasma a 0°C se trata con alcohol de 95% hasta alcanzar una concentración del 8% a un pH 7,2, al tiempo que se baja la temperatura a -3°C, con lo que se obtiene un precipitado que constituye la fracción de la que se extrae el fibrinógeno con cuya fracción se llevan a cabo dos extracciones sucesivas con tampón citrato de pH 6[±]0,05, con fuerza iónica 0,3, adicionado de 1 M de glicocola y 6,5% de alcohol etílico, obteniéndose una segunda fracción que se disuelve con tampón citrato igual al anterior pero de pH 6,35[±]0,05, iniciándose la disolución con el tampón en estado granizado para terminar la operación a 30°C en un tiempo máximo de 30 minutos, tras lo cual se centrifuga y la solución de fibrinógeno se filtra y se liofiliza. - - - - -

El tampón citrato está constituido por una solución de citrato sódico 0,055 M y pH 6,0[±]0,05, ajustado con ácido clorhídrico concentrado, a la que se añade 75 gramos de glicocola y 65 ml. de alcohol absoluto, completando



304013

↓
filtrado
↓
licofilizado

FIBRINOGENO.

- A una masa de plasma humano, con una concentración de proteína del 5% y a 0°C, se le va añadiendo alcohol del 95% hasta alcanzar una concentración del 8% a pH 7,2 al tiempo que la temperatura se disminuye gradualmente hasta -3°C, con lo que se obtiene un precipitado, constituyente de la fracción I de la que se obtiene el fibrinógeno,
- 5.
10. que se separa por centrifugación. El sobrenadante se reserva para otros fines. La fracción I contiene entre el 40 y 50% de proteína coagulable con trombina. - - - - -

- Seguidamente la fracción I se extrae con un tampón citrato de pH 6±0,05, conteniendo 6,5% de alcohol etílico y 1 M de glicocola, con fuerza iónica 0,3, el cual se prepara con una solución de citrato sódico 0,055 M y ajustado el pH a 6±0,05 con ácido clorhídrico concentrado. Habida esta solución se mezclan 75 gramos de glicocola, 65 ml de alcohol absoluto y se completa el volumen hasta 1000 ml con la solución tampón citrato arriba indicada. - - - - -
- 15.
- 20.

- Cada 100 gramos en peso húmedo de fracción I se extraen con 1000 ml de solución tampón granizada (-3°C) la cual se añade bajo suave agitación hasta obtener una pasta uniforme, se adiciona todo el tampón restante y la suspensión se agita durante una hora a -3°C, centrifugándose luego la mezcla a dicha temperatura. - - - - -
- 25.

Se realiza una segunda extracción de la fracción



SEP 1964

304013

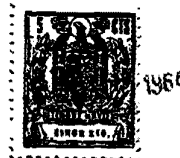
I en las mismas condiciones que la extracción primera. - -

El residuo de fracción I purificado se denomina fracción I-0 y es el fibrinógeno que se emplea para uso terapéutico. - - - - -

5. Inmediatamente después de las extracciones, la fracción I-0 se disuelve en tampón citrato de pH $6,35 \pm 0,05$, cuya composición es igual al del citado anteriormente, con la única variación del pH. - - - - -

10. La primera porción de tampón citrato que se añade a la fracción I-0, debe estar granizada y se añade gradualmente bajo agitación. Se utilizan unos 400 ml. de tampón para cada 100 gramos de fracción I original. El recipiente se traslada a un baño maría a temperatura de 30°C y la suspensión se va agitando a esta temperatura hasta que todo el material se ha disuelto en como máximo 30 minutos. La solución obtenida se centrifuga a 2.000 g. a temperatura ambiente, el sobrenadante se filtra a través de una capa de Hyflo Super Cel o a través de un filtro de vidrio de Jena G4 e inmediatamente a través de un filtro de vidrio bacteriológico, Jena G 5M, poro de 1,5-1,0 micras. La solución de fibrinógeno se
15. liofiliza en condiciones estériles - - - - -
20.

En la tabla que sigue, se muestra la purificación lograda por este procedimiento comparando los valores de coagulabilidad, contenido en proclombina, plasminógeno y
25. proactivador del plasminógeno. - - - - -



304013

	Plasma	Fracción I	Fracción I-0
Fibrinógeno	0,25 %	40-50%	86-89%
Protrombina	100	1,8	0,085
Plasminógeno	1660	518	288
5. Proactivador	100	5,7	2,1

El contenido en fibrinógeno o proteína coagulable es en la fracción I-0 entre 86 y 89%. El rendimiento de fibrinógeno es alrededor del 95% del fibrinógeno contenido en la fracción I, sin embargo, en las filtraciones hay pérdida considerable de producto de manera que el rendimiento final en la preparación estéril es entre 70 y 80%. La fracción I contiene alrededor de 1,8 a 2% de la protrombina del plasma, y en la fracción I-0 este valor desciende a 0,085%, eliminándose el 95% de la protrombina contenida en la fracción I, valor despreciable que ya no afecta a la estabilidad del fibrinógeno purificado. Durante la purificación se elimina prácticamente el 50% del plasminógeno y del proactivador contenido en la fracción I. - - - - -

Habiendo efectuado la descripción precedente, debe hacerse constar que en la realización de esta Patente podrán aplicarse las variantes de detalle que la experiencia y la práctica puedan aconsejar, siempre que con ello no se desvirtue su esencialidad, que es la que se resume y concreta en los términos de las reivindicaciones que siguen. - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España y todos sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes:



304013

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la obtención de fibrinógeno, tanto a partir de plasma humano como de plasma bovino, caracterizado por el hecho de que la masa de plasma a 0°C se trata con alcohol de 95% hasta alcanzar una concentración del 8% a un pH 7,2, al tiempo que se baja la temperatura a -3°C, con lo que se obtiene un precipitado que constituye la fracción de la que se extrae el fibrinógeno, con cuya fracción se llevan a cabo dos extracciones sucesivas con

5. tampón citrato de pH 6 ± 0,05, con fuerza iónica 0,3, adicionado de 1 M de glicocola y 6,5% de alcohol etílico, obteniéndose una segunda fracción que se disuelve con tampón citrato

10. igual al anterior pero de pH 6,35 ± 0,05, iniciándose la disolución con el tampón en estado granizado para terminar la

15. operación a 30°C en un tiempo máximo de 30 minutos, tras lo cual se centrifuga y la solución de fibrinógeno se filtra y se liofiliza. - - - - -

2.- Procedimiento para la obtención de fibrinógeno, según la anterior reivindicación, caracterizado por el

20. hecho de que el tampón citrato está constituido por una solución de citrato sódico 0,055 M y pH 6,0 ± 0,05, ajustado con ácido clorhídrico concentrado, a la que se añade 75 gramos de glicocola y 65 ml. de alcohol absoluto, completando 1000 ml. el volumen total. - - - - -

25. 3.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FIBRINOGENO". - - - - -



304013

Todo ello tal como se describe y reivindica en la presente memoria que consta de nueve hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID. 12 SET. 1964

[Handwritten signature]