

20



PATENTE DE INVENCION

309.630

Your ref: 9112.

309630

Memoria Descriptiva

sobre

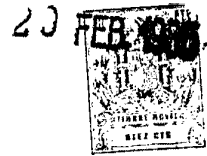
"Procedimiento de preparación de un material
anticoagulante".

Solicitante: NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION,
entidad británica, residente en 1
Tilney Street, Londres, W.1., Inglaterra.

Esta invención se refiere a substancias que tienen una actividad en relación con la coagulación de la sangre de los mamíferos.

El resultado de la coagulación de la
5. sangre de seres humanos y otros mamíferos tiene

3 0963 0



-2-

- lugar mediante un mecanismo complicado que se presenta en varias etapas. En la última etapa del proceso, el fibrinógeno de la sangre es convertido por medio de la trombina enzimática en "fibrina monómera" que entonces sufre una polimerización para producir fibrina, el material coagulado. Se ha descubierto ahora que existe en el veneno de la *Ancistrodon Rhodostoma* (Boie) (víbora de Malaya), una encima de acción similar a la trombina pero que modifica el fibrinógeno de la sangre de tal manera que la fibrina producida de ella tiene propiedades distintas a aquellas del coágulo normal formado de la trombina. La fibrina influenciada por este encima es de carácter ligero y, como resultado de la continua corriente sanguínea en vivo se dispersa insensiblemente en los conductos sanguíneos evitando la formación del coágulo. Se ha descubierto que se puede purificar el veneno de la A. *Rhodostoma* mediante la eliminación de los constituyentes proteolíticos, los cuales causan una reacción local fuerte y otros efectos secundarios indeseables y que en la producción es una composición purificada en la cual las propiedades de las encimas anticoagulantes desfibrinadoras se pueden emplear en la terapéutica así como para fines de investigación. Se ha verificado por otra parte que el principio activo puede ser aislado del veneno en una forma muy pura, como más adelante se describe.

La substancia activa purificada de esta invención se caracteriza por las siguientes pro-



piedades fisicoquímicas y biológicas determinadas en un material que no contiene más de 1 o 2% de impurezas proteínicas.

5. 1º. Es proteínico y substancialmente incoloro cuando es puro.
- 2º. Es absorbido por un material intercambiador de aniones débilmente básico, tal como la celulosa dietilaminoetílica y la celulosa trietilaminoetílica.
10. 3º. Es soluble en solución fisiológica salina.
- 4º. Tiene una movilidad electroforética (+) de $3,93 \times 10^{-5}$ voltios/cm/seg. en solución amortiguadora de fosfato 0,1M del pH 7,0.
- 5º. Tiene un peso molecular de aprox. 38.000 - 40.000 determinado en la ultracentrífuga.
15. 6º. Tiene un coeficiente de sedimentación de $S_{20}^W = 3,40$ svedbergs.
- 7º. Tiene un volumen específico parcial de 0,66.
- 8º. Muestra dos bandas de precipitina sobre inmunoelectroforesis contra el anti-veneno específico por medio del método de difusión de agar.
20. 9º. Su actividad biológica es similar a la trombina, anticoagulante en vivo, pero no-proteolítica.
- 10º. No es inhibido por el di-isopropilfluorofosfato
25. $10^{-3}M$.
- (*) Esta cifra se cita en preferencia a los valores entre 5,5 y 6,0 como se determina en un amortiguador barbutírico a un pH del 8,6.

30. La substancia activa ejerce rápidamente su efecto desfibrinante, después de su administra-

309630



-4-

ción, y se mantiene en el cuerpo durante largos periodos, por ej. hasta dos semanas, en comparación al grupo de los anticoagulantes del grupo de la heparina.

Por otra parte, su acción se puede invertir rápidamente por medio del antiveneno específico. Es no-tóxico, altamente activo en concentraciones muy bajas y no produce complicaciones hemorrágicas espontáneas.

5.

Es altamente específico en su acción y

parece que no tiene efectos sobre otros factores del mecanismo de coagulación de la sangre, aparte del fibrinógeno.

10.

Como resultado de esta combinación de propiedades es valioso para el tratamiento de la trombo-
sis, especialmente durante el período en el cual son elevadas las probabilidades de un segundo ataque, quizás fatal. La substancia pura es estable durante largos periodos de tiempo a -20°C .

15.

De acuerdo con la invención se obtiene un preparado farmacéutico para el tratamiento de la sangre de los mamíferos para administración parenteral, sometiendo el veneno de *A. Rhodostoma* a una cromatografía sobre un material intercambiador de aniones débilmente básico adecuado para la absorción de proteínas, es decir, de basicidad suficientemente débil para evitar una desnaturalización de la proteína y recuperar del material una fracción conteniendo el principio activo arriba especificado y sustancialmente libre de encimas proteolíticas. Materiales intercambiadores de aniones débilmente básicos son ciertos carbohidratos conteniendo grupos básicos y en la práctica

20.

25.

30.

- la celulosa dietilaminoétflica (Celulosa DEAE) y la celulosa trietilaminoétflica (celulosa TEAE) son materiales altamente convenientes para ser usados para el propósito de esta invención, dándose preferencia especial a estos últimos debido a la mayor facilidad con que permiten que sea separado el material activo de la oxidasa del ácido amínico. La fuerza básica del material, que se determina según el grado de sustitución por grupos aminoétflicos, es un factor importante para la conservación de la estabilidad de la proteína activa y no debiera ser demasiado elevada. La basicidad del material, expresado usualmente como mili-equivalentes por gramo, determinará en parte las molecularidades de los amortiguadores eluidores empleados en la separación y las combinaciones óptimas se determinarán fácilmente mediante experimentación. El sephadex DEAE y los materiales similares tienen una basicidad distinta a la celulosa DEAE y exigirá una selección del sistema de amortiguador y de las concentraciones adecuadas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- El material activo es recuperado mediante elución de la columna intercambiadora de aniones y, con celulosa DEAE y celulosa TEAE mediante elución gradual con amortiguadores de molecularidad creciente, por ej. el amortiguador tris-fosfato que ha dado excelentes resultados. Tris es una abreviación de tris(hidroximetil)aminometano. Por ejemplo con la celulosa TEAE de 0,7 mili-equivalentes/gr de capacidad, los constituyentes indeseables del veneno se eluyen con amortiguador tris-fosfato de un
- 25.
- 30.

3 09630



-6-

- pH 6,0 en concentraciones crecientes escalonadamente hasta alrededor de 0,04 M, después de lo cual el material activo se puede eluir con el mismo amortiguador a concentraciones de 0,09 M a 0,1 M o ligeramente mayores. La solución del material activo que abandona la columna puede, si se desea, ser secado por congelación para producir un polvo ligero que se puede almacenar en ampollas a baja temperatura, bien en cantidades grandes o en unidades de dosis. Alternativamente, la solución se puede hacer isotónica mediante ajuste de sus electrolitos con tris u otro amortiguador, después de lo cual se puede esterilizar por filtración para obtener así una composición directamente adecuada para administración parenteral. Esta solución, o la obtenida por reconstitución del polvo secado por congelación, se puede administrar bien en forma intravenosa o intramuscular, en una dosis de por ejemplo 0,2 - 2 microgramos de sustancia activa por kilo. En el perro, las dosis aún tan elevadas como 1500 microgramos por kilo son toleradas sin efectos adversos y la sangre permanece incoagulable durante largos periodos.

La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes:

25. EJEMPLO 1 -

- Celulosa trietilaminoética en polvo (Serva) con una capacidad de 0,71 m. equival/gr. se suspende en cloruro sódico 2M amortiguado con tris/fosfato 0,1 M del pH 6,0 y la mezcla pastosa se introduce en una columna de cristal de 3,6 cm de diá-



-7-

metro hasta que la altura del material introducido alcanza 20 cm. La columna se lava con otros 2 L del disolvente empleado para la preparación de la mezcla pastosa y entonces se equilibra con amortiguador

5. tris-fosfato 0,01 M del pH 8,5. Tris es la abreviación para tris(hidroximetil)aminometano.

- 330 - 360 mg de veneno A. Rhodostoma crudo se disuelven en 20 ml de amortiguador tris-fosfato 0,01 M del pH 8,5, se centrifuga para retirar el material insoluble y el sobrenadante claro se introduce en la columna. La fraccionación se efectúa a temperatura ambiente a un ritmo de 90-100 ml/hora. La concentración proteínica en el eluado se calcula desde la extinción de la solución a 280 m en células de 1 cm.
- 10.
- 15.

El cromatograma se revela con los amortiguadores siguientes. En todos los casos la molecularidad de los amortiguadores son con referencia al tris.

20. Tris-fosfato 0,01 M del pH 8,5 (para lavar el veneno al interior de la columna) (Fracciones 1,2 y 3)
- Tris-fosfato 0,01 M del pH 7,0 (Fracción 4)
25. Tris-fosfato 0,02 M del pH 6,0.
- Tris-fosfato 0,04 M del pH 6,0 (Fracción 5)
- Tris-fosfato 0,10 M del pH 6,0 (Fracción 6)
- Tris-fosfato 0,10 M + NaCl 0,10 M del pH 6,0 (Fracción 7)

3 09630



-8-

Los cambios en el amortiguador eluyente se hacen después de haber equilibrado la columna con el amortiguador. Las fracciones proteínicas obtenidas de esta forma son ensayadas con respecto a su actividad coagulante.

5.

Menos de 1% de la actividad coagulante aplicada se recupera en la fracción nº 1, 2, 3 y 4. La fracción 1, sin embargo, posee actividad proteolítica, la cual en soluciones concentradas disolvería los coagulos de fibrina. La presentación de la actividad coagulante se resume en la tabla siguiente:

10.

Fracción Nº	Umid./ml.	E ₂₈₀	Actividad específica
Veneno crudo	100	0,174	574
5	9	0,085	106
6	78	0,0125	6240
7	35	0,0540	648

15.

Unid. Estas unidades son arbitrarias, 100 unidades se refieren al tiempo de coagulación del veneno inicial diluido (1/100).

20.

E₂₈₀ Extinción de la fracción en la dilución empleada para el ensayo de la actividad similar a la trombina.

25.

La recuperación del material similar a la trombina alcanza entre 50 - 65% en la fracción 6, el material restante aparece en las fracciones 5 y 7.

La actividad similar a la trombina se eluye de estas columnas en cantidades importantes con una fuerza del amortiguador de 0,04 M o mayor.

30.

El eluado se seca por congelación para

3 09630

20



-9-

dar un producto ligeramente pulverulento.

Rendimiento: 18 - 20 mg por 350 mg de veneno seco.

EJEMPLO 2 -

5. El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 necesita alrededor de 36 horas para ser completado.

Una modificación del procedimiento de fraccionamiento en el que se invierten 14 horas es como sigue:

10. La longitud de la columna se reduce a 15 cm y se equilibra con tris-fosfato 0,01 M del pH 6,0. El veneno crudo (350 mg) se disuelve en 20 ml de tris-fosfato 0,01 M del pH 6,0 y después de centrifugar se introduce en la columna. La columna se eluye con este amortiguador hasta que no eluya más proteína y entonces con lo siguiente:

Tris-fosfato 0,02 M del pH 6,0

Tris-fosfato 0,035 M del pH 6,0

Tris-fosfato 0,09 M del pH 6,0

20. La pureza del material obtenido con el último disolvente es tan buena como la obtenida en el ejemplo 1 y, en algunos casos, el rendimiento se aumenta en casi un 70%.

25. Como en el Ejemplo 1, el producto se puede recuperar mediante secado por congelación o la solución final se puede ajustar a un pH fisiológico y hacerla isotónica agregando tris-fosfato y después esterilizar por filtración.

Método de ensayo de la actividad similar a la trombina:

30. 0,1 ml de plasma bovino oxalado se incuba a 37° con 0,1 ml de cloruro sódico.

309630

20



-10-

0,15 M amortiguado con tri-hidroxi-amino, metano (tris)/Cl⁻ 0,01 M del pH 7,5.

- A esto se agregan 0,1 ml de CaCl₂ 0,025 M seguido de 0,1 ml de una fracción del veneno y se registra el tiempo de coagulación de la mezcla. Los tiempos de coagulación obtenidos con una serie de concentraciones del veneno se llevan a un diagrama de coordenadas en escala logarítmica resultando una línea recta. En la operación del proceso de extracción del material activo por cromatografía sobre celulosa DEAE o celulosa TEAE; el pH, la molecularidad y las demás condiciones están relacionadas entre sí, y como mejor se determinan es por experimentación. Como guía, sin embargo, se puede indicar que, después de la elución de la fracción proteolítica, el material deseado se puede eluir con un amortiguador de trisfosfato con un pH de 5,5 hasta 7,5 y una molecularidad desde 0,04 M en adelante, ajustándose la molecularidad total de la solución como mínimo a 0,08, cuando sea necesario, con cloruro sódico u otras sales adecuadas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente presentada en Inglaterra nº 7264/64 de 21 de febrero de
- 25.
- 30.



- 1.964 acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN MATERIAL ANTICOAGULANTE"; caracterizándose por lo siguiente:
5. 1ª - Procedimiento de preparación de un material anticoagulante que es proteínico y substancialmente incoloro cuanto es puro, que el absorbido por un material intercambiador de aniones débilmente básico, que es soluble en solución fisiológica salina, que tiene una movilidad electroforética de $3,93 \times 10^{-5}$ Voltios/cm/seg. en solución amortiguadora de fosfato 0,1 M del pH 7,0, que tiene un peso molecular de aprox. 38,000 - 40,000, que tiene un coeficiente de sedimentación de $S_{20}^W = 3,40$ svedbergs, que tiene un volumen específico parcial de 0,66, que muestra dos bandas de precipitina sobre immuno-electroforesis contra el antiveneno específico por medio de difusión de agar, cuya actividad biológica es similar a la trombina, anticoagulante, en vivo, pero no-proteolítica y que no es inhibido por el di-isopropil-fluorfosfato $10^{-3}M$, caracterizado, porque el veneno Acistrodon Rhodostoma se somete a una cromatografía en un material intercambiador de aniones débilmente básico adecuado para la absorción de proteínas y se recupera una fracción que contiene el material activo arriba especificado substancialmente libre de enzimas proteolíticas.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

3 09630



-12-

2ª - Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el material intercambiador de aniones es celulosa dietilaminoetífica o celulosa trietilaminoetífica.

5. 3ª - Procedimiento, según la reivindicación 1ª y 2ª, caracterizado porque la columna de material se eluye en forma escalonada con amortiguador de tris-fosfato de molecularidad creciente, recogiendo la fracción activa después de haber sido eluidos los constituyentes proteolíticos del veneno.

10. 4ª - Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado porque los constituyentes proteolíticos, y demás indeseados, se eluyen a un pH 6 con amortiguador hasta 0,04 molecular, eluyéndose la fracción anticoagulante con amortiguador de una molecularidad de 0,09 - 0,10.

15. 5ª - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fracción recuperada, que contiene el material anticoagulante, se seca por congelación.

20. 6ª - Procedimiento, según las reivindicaciones 3ª o 4ª, caracterizado porque el material que contiene el coagulante se pone a isotónico y se esteriliza.

25. 7ª - Procedimiento de preparación de un material anticoagulante, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

309630



-13-

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

Madrid,

20 FEB. 1965

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION,

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY