

353435



PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita a favor de la firma BAXTER  
LABORATORIES INC., de nacionalidad estadounidense , domici-  
liada en Morton Grove, Illinois ( Estados Unidos), y que ha  
5 de recaer sobre " PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN CONCEN-  
TRADO DEL FACTOR ANTIHEMOFILICO ( AHF, Factor VIII) " .

=====

Memoria descriptiva

El registro de la patente de invención que se solicita  
tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo  
10 el territorio nacional y sus posesiones de un procedimiento de  
preparación de un concentrado del factor antihemofílico (AHF,  
Factor VIII), conforme se describe a continuación.

**POOR  
QUALITY**



El proceso de la coagulación de la sangre es una actividad importante, que la sangre completa normal es capaz de efectuar en circunstancias de tiempo para prevenir una excesiva pérdida de sangre por heridas abiertas o hemorragias internas. Es sabido que la sangre completa normal contiene un factor que se halla ausente, o seriamente deficiente, en los hemofílicos. Este factor está asociado a la fracción sanguínea globulina y ha venido a ser conocido como factor antihemofílico ( AHF, Factor VIII).

Los científicos tienen conocimiento acerca del A H F y su función coagulante de la sangre desde hace algún tiempo y el tratamiento de la hemofilia, hasta ahora, ha consistido, generalmente, en una terapia de reemplazamiento, mediante la cual, el paciente recibe transfusión de muchos litros de sangre completa fresca o de plasma especialmente preparado.

Es sabido, sin embargo, que bajo condiciones de almacenamiento usuales la sangre completa y el plasma líquido pierden su actividad de AHF en un día, aproximadamente. Aunque es posible congelar y almacenar plasma fresco, la actividad AHF en el plasma congelado tiene una vida relativamente corta: de algunos meses , poco más o menos.

Es, también, posible disminuir la pérdida de actividad del AHF durante el almacenamiento mediante desecación de plasma recién congelado, pero no ha sido posible, hasta la fecha, saber con certeza la fuerza del AHF en este material desecado ya que la cantidad de AHF en individuos normales donantes del plasma varía ampliamente, desde alrededor de 50% hasta alrededor de 200% , en término medio.

La terapia convencional de reemplazamiento adolece, también, de otras serias desventajas, ya que los hemofílicos desarrollan frecuentemente estados alérgicos o refractarios



cuando se les trata con plasma repetidamente. Además, las grandes cantidades de plasma necesitadas por los hemofílicos, tienden a causar hipovolemia o sobrecarga del sistema circulatorio. Esta sobrecarga motiva un esfuerzo en el corazón que amenaza al paciente con deficiencia cardíaca.

Los científicos han propuesto, también, varios métodos para aislar el AHF o para preparar fracciones de plasma ricas en AHF de sangre humana o animal. En la práctica, estos métodos conocidos hasta ahora han resultado ser de poca confianza, puesto que la actividad del AHF de las fracciones tiende a perderse durante la operación de aislamiento. El AHF es una lábil proteína de indicación que es difícil de separar completamente de las otras proteínas del plasma, particularmente del fibrinógeno, y el rendimiento de AHF del plasma por estos métodos de la técnica anterior no ha sido alto. Las potencias AHF de los preparados anteriores de fracciones de sangre para la terapia hemofílica, se sabe que son bajas y el costo del tratamiento es alto.

Otros inconvenientes en los anteriores intentos de aislar el AHF son que el AHF es prestamente susceptible de desnaturalización por calor, congelación y deshielo, así como por continuado almacenamiento.

Entre los varios métodos propuestos hasta ahora para el aislamiento de AHF están la cromatografía, la absorción en lote y la lavigación, así como la precipitación selectiva. Varios de los agentes precipitantes usados son el etanol, el éter etílico, el sulfato amónico, el citrato fosfósódico, los aminoácidos y los procedimientos de crioprecipitación. Recientemente ha sido revelado por Webster y al. el uso clínico de una fracción de plasma completo de AHF precipitado en glicina, Amer. J. Med. Sciences, Vol.



250, nº 6 pp. 643-650 (1965), y los ensayos clínicos de terapia de reemplazamiento de AHF con una fracción de plasma completo, crioprecipitado por el sistema de bolsa cerrada, comunicados por Pool y al., New England J. Med., vol. 273 nº 27 pag. 1.443-1.447 (1965). Ninguno de los anteriores métodos sin embargo, ha resultado ser un método completamente práctico para aislar el AHF.

De acuerdo con la presente invención, diferenciándose de la técnica anterior, se provee un método de preparación de un AHF estable de alta potencia, que comprende el fraccionamiento de un concentrado de crioprecipitación de AHF humana o animal.

Tal como aquí se emplea, el término "concentrado de crioprecipitación de AHF" se refiere al precipitado obtenido por la congelación de plasma sanguíneo humano o animal  $\leq 4^{\circ} \text{C}$  y separado de lo que sobrenada. Es preferible que este concentrado de crioprecipitación de AHF se obtenga por congelación rápida de plasma fresco, pero también puede usarse plasma almacenado como fuente de material en la práctica de la presente invención. También es preferible llevar a cabo la congelación a una temperatura entre unos  $-20^{\circ} \text{C}$  y unos  $-40^{\circ} \text{C}$  seguida de un lento deshielo hasta unos  $4^{\circ} \text{C}$ .

En adición a la estabilidad y alta potencia de la actividad del AHF obtenida por el procedimiento de la presente invención, el uso del concentrado de crioprecipitación del AHF, con preferencia al plasma completo como material de partida, tiene la ventaja de permitir la retención de otros componentes de plasma, tal como albúmina, globulina gamma y semejantes que, usualmente, se destruyen cuando el plasma completo se purifica por los métodos ya conocidos de preparación de



fracciones AHF, para uso en el tratamiento de la hemofilia.

De acuerdo con la presente invención, el concentrado de crioprecipitación de AHF se fracciona, preferentemente, para que rinda un AHF estable de alta potencia, usando medios que comprenden una o más de las siguientes fases:

- a) precipitación con glicina,
- b) precipitación con polietileno glicol.

En la fase de precipitación de glicina, el concentrado de crioprecipitación de AHF se vuelve a disolver primeramente y, después, esta fracción ya disuelta de nuevo se precipita con una solución acuosa de glicina que tenga una molaridad de entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 1,8, seguida de la recuperación y nueva disolución del precipitado.

La recuperación del concentrado de crioprecipitación y de la fracción de glicina precipitada, para uso en esta invención, puede realizarse, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración de los respectivos precipitados, o por procedimientos similares.

La nueva disolución de los precipitados recuperados puede efectuarse calentándolos y agitándolos en solución salina citratada. En el caso de nueva disolución del concentrado de crioprecipitación, se prefiere usar una solución salina citratada de glicina, y aumentar el volumen del concentrado de crioprecipitación hasta, aproximadamente, una décima parte del volumen del plasma original que represente el concentrado de crioprecipitación. La fracción precipitada de glicina se vuelve a disolver, preferentemente con solución salina citratada, para aumentar el volumen de la fracción hasta, aproximadamente, una vigésima parte del volumen de plasma que la fracción precipitada de glicina represente.

Es también preferible purificar cada una de las respectivas disoluciones repetidas de concentrado de criopreci-



pitación y de fracción precipitada de glicina , mediante clarificación por centrifugación adicional y/o filtración, para eliminar cualquier materia insoluble.

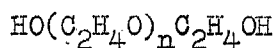
5 El antedicho fraccionamiento de un concentrado de crioprecipitación de AHF, mediante precipitación con glicina, se ha hallado que proporciona un concentrado de AHF de alta potencia que puede ser congelado y estabilizado, por ejemplo mediante liofilización y mantenido, bajo condiciones ordina-  
10 rias de refrigeración, durante periodos de un año, o aún más. largos. La potencia de cada lote de material preparado mediante el antedicho método de fraccionamiento, puede determinarse con precisión, de forma que el médico que lo prescriba.pueda conocer, por primera vez exactamente, que cantidad de AHF re-  
cibe su paciente.

15 Puesto que el preparado de concentrado AHF, nuevamen- te disuelto por el método de fraccionamiento antedicho, tiene más de cinco veces la actividad de AHF de un volumen igual de plasma, se puede dar al hemofilico una cantidad de AHF que; de otro modo no podría tolerar el corazón. De modo to-  
20 davia más importante, la actividad AHF en el concentrado pre- parado como se ha indicado arriba está contenida en menos de una decimoquinta parte de la cantidad de proteina presente en el plasma capaz de proveer una cantidad igual de actividad AHF. Este bajo contenido de proteina minimiza la probabilidad  
25 de reacciones alérgicas para el hemofiílico receptor y re- duce la posibilidad de sobrecargar el sistema circulatorio.

Otro ejemplo de los medios que pueden usarse para frac-  
30 cionar el concentrado crioprecipitado de AHF, de acuerdo con la presente invención, es la precipitación con polietileno glicol. Los polietilenos glicoles son polímeros de alto peso



molecular que se producen, generalmente, haciendo reaccionar óxido de etileno con glicol de etileno o agua y tienen la siguiente estructura química.



5 en la cual "n" representa el número promedio de grupos oxietileno. De acuerdo con la presente invención, los polietilenos glicoles deben ser no tóxicos y pueden estar en una escala de peso molecular de unos 200 a unos 20.000. Preferentemente, tienen pesos moleculares entre unos 400 y unos 6.000 el P.E.G. 10 4.000, que es un producto de polietileno glicol que tiene un peso promedio molecular de 4.000, es el producto preferido de este grupo.

En la fase de precipitación del polietileno glicol, se prefiere usar desde aproximadamente 3% a aproximadamente 4% 15 de polietileno glicol, al peso, del concentrado nuevamente disuelto de AHF con retención de lo que sobrenade, seguido por el empleo de aproximadamente 10% de polietileno glicol al peso de lo sobrenadado con retención del precipitado. El último precipitado se recupera, entonces, y se vuelve a disolver 20 en solución salina citratada.

La fase de precipitación de polietileno glicol puede también ser empleada en combinación con la fase de precipitación de glicina. Si la fase de precipitación de polietileno glicol precede a la fase de precipitación de glicina, la molaridad de la glicina empleada para la precipitación debe ser 25 de aproximadamente 1,8.

El preparado de concentrado del AHF mediante las fases de precipitación sucesivas con glicina y polietileno glicol, como se ha descrito anteriormente, puede ser congelado y hecho



estable, por ejemplo mediante liofilización y retenido, bajo condiciones ordinarias de refrigeración, durante periodos de un año o más. El concentrado AHF reconstituido tiene más de treinta veces la actividad de AHF de un volumen igual de plasma; y la actividad AHF de éste concentrado está contenida en menos de una centesima de la cantidad de proteína presente en el plasma, para una cantidad igual de actividad AHF.

5

El concentrado de crioprecipitado de AHF, que ha sido fraccionado mediante precipitación de glicina y/o precipitación de polietileno glicol, puede, además, tratarse mediante purificación con resina de celulosa ECTEOLA. Esta purificación puede tener lugar, indiferentemente, antes o después de la precipitación de glicina y/o polietileno glicol y puede ser realizada mediante las técnicas de columna o de lote. El concentrado purificado mediante este método tiene la ventaja adicional de que puede, también, ser administrado por via intramuscular lo mismo que por via intravenosa, métodos generalmente usados en el caso del concentrado del AHF que no haya sido tratado con resina de celulosa ECTEOLA. El concentrado de AHF purificado con resina de celulosa ECTEOLA se ha hallado que está libre de fibrinógeno mediante la adición de trombina y mediante inmuno-electroforesis.

10

15

20

Tal como aquí se emplea, el término "resina de celulosa ECTEOLA" se refiere a una celulosa modificada que contiene sustituyentes básicos activos introducidos en la molécula de celulosa mediante reacción, con epíclorhidrina y trietanolamina. Métodos de preparación de resinas de celulosa ECTEO-LA han sido descritos de manera general por Sober y Peterson, J. Am. Chem. Soc'y., volumen 76, páginas 1.711-12 (1956); idem, volumen 78 pag. 751-55 (1956) volumen 78, pag. 756-63 (1956); y Peterson y Sober, Biochem. Preparations, volumen 8 pag. 43-44 (1961).

25

30



Las resinas de celulosa ECTEOLA pueden obtenerse en el comercio. Sin embargo, se ha hallado deseable tratar inicialmente estas resinas repitiendo el ciclo con sosa caústica, antes de usarlas en el procedimiento aquí definido.

5           En el procedimiento de purificación con resinas de celulosa ECTEOLA, la resina es preferiblemente equilibrada, primero, con una solución condensadora de cloruro que tenga una concentración de aproximadamente 0,8% NaCl y, entonces, vertida en una columna de vidrio cromatográfico. El concentrado AHF  
10           que se desea purificar, se aplica, entonces, a la columna y finalmente se lava con una solución condensadora de cloruro que tenga una molaridad de aproximadamente 0,5.

          Otros métodos de purificación de concentrado AHF de la presente invención resultarán evidentes a las personas expertas en la técnica.  
15

          Los siguientes ejemplos ilustran, además, la presente invención, si bien esta última no está limitada a estos ejemplos específicos, que se facilitan a fines ilustrativos y no limitativos. Todas las partes y los porcentajes que aquí se mencionan  
20           son a base de peso, salvo que se especifique otra cosa.

#### EJEMPLO 1

          Un concentrado AHF humano estable de alta potencia se prepara mediante fraccionamiento sucesivo de plasma sanguíneo humano, primeramente, mediante crioprecipitación y después mediante precipitación de glicina en la forma siguiente: :  
25

#### REACTIVOS

Salina citratada - Una parte de citrato sódico molar de 0,1 para cuatro partes al peso de salina al 0,9%.



Salina citratada de glicina - A la anterior salina citratada se le agrega suficiente glicina para formar una solución molar de 0,1 respectiva de glicina.

5 Agua de lavado compensada - Agréguese a agua destilada 1/100 en volumen de citrato compensado, que se elabora ajustando citrato sódico molar 0,5 con ácido cítrico molar 0,5 para lograr un pH 6,88.

Acido acético - Prepárense dos soluciones, acuosas: una normal de 1,0 y otra normal de 0,1

10 Glicina - Prepárese una solución acuosa molar de 1,3

#### PROCEDIMIENTO

15 Se recibe plasma sanguíneo humano congelado ( $\leq 4^{\circ} C$ ) de un centro donante. El plasma se pone en ollas Pfaudler y, mientras se mantiene a una temperatura de menos de  $4^{\circ} C$ , se centrifuga mediante fluencia constante o centrifugación de cubo. El crioprecipitado resultante se recoge y se retiene para otro ulterior fraccionamiento, de acuerdo con la presente invención.

20 Al crioprecipitado se adiciona glicina citratada, siendo la cantidad una décima parte del volumen de plasma que representa el crioprecipitado. Se obtiene una disolución mezclando el crioprecipitado y la salina citratada de glicina en un ambiente templado (temperatura de la habitación, pero que  
25 no ha de exceder  $30^{\circ} C$ ):

Cuando se ha disuelto el crioprecipitado, puede ser clarificado, si se desea, (esto depende de la cantidad de células rojas y proteína desnaturalizada presente), mediante otra centrifugación y/o filtración.

30 El crioprecipitado disuelto se ajusta, entonces, al pH de 6,88 con ácido acético normal de 0,1. Por medios ade-



cuados (por ejemplo, refrigeración o uso de baño de hielo seco de isopropanol) la solución se enfria a una temperatura de entre 6° C y 10° C. A la solución enfriada se agrega suficiente glicina para hacer la solución molar de 1,2 con respecto a la glicina. La mezcla se agita suavemente durante 45 a 60 minutos a una temperatura de entre 2° C y 10° C y, entonces, se centrifuga por fluencia continua o refrigeración de cubo. El precipitado de glicina resultante se recoge y se lava suavemente con agua compensada a una temperatura de 0° a 4° C.

Al precipitado de glicina se agrega solución salina citratada en una cantidad igual a la vigesima parte del volumen de plasma representado por el precipitado de glicina. La disolución se realiza mezclando el precipitado de glicina y la salina citratada en un ambiente templado (temperatura del local, pero que no exceda de 30° C).

Cuando el precipitado de glicina está disuelto, es preferible clarificar la solución por centrifugación y/o filtración usando un filtro milliporo de 293 mm (membranas usadas: 1,2 micrones, 0,45 micrones y 0,3 micrones).

El producto de plasma sanguíneo líquido preparado de la manera antedicha mediante fraccionamiento sucesivo, primeramente por crioprecipitación y después por precipitación de glicina, tiene una concentración de AHF de alta potencia. Este producto líquido es, entonces, congelado por congelación en cáscara (-60° C) y se refrigera en un refrigerador relámpago (-20° C a -30° C) durante, por lo menos, tres horas. El producto congelado puede, entonces, conservarse bajo condiciones ordinarias de refrigeración ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ,



preferentemente entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ ), sin pérdida de su actividad AHF, durante periodos de tiempo de un año y aún más largos. Este producto, cuando se reconstituye para su administración contiene cinco veces la actividad de AHF de un volumen igual de plasma sanguíneo normal y está contenido en solamente  
5 en 1/15 de la cantidad de proteína presente en el plasma para igual magnitud de actividad AHF. El producto reconstituido puede administrarse por vía intravenosa a los hemofílicos mediante los medios de transfusión convencional requeridos.

10

EJEMPLO 2

Se repite el ejemplo 1 hasta inclusive la fase de adición de salina citratada al precipitado de glicina. El precipitado nuevamente disuelto se ajusta a un pH 6,5 con ácido acético normal de 1,0. Se agrega a la solución polietileno glicol 4000  
15 para formar P E G concentrado al 3,5%. La mezcla se agita suavemente a la temperatura del ambiente durante diez minutos y, entonces, se centrifuga durante quince minutos a 5.000 rpm. Lo sobrenadado se decanta y ajusta a pH 6,88 con hidróxido sódico normal de 1,0. Se agrega a la solución polietileno glicol 4.000  
20 adicional para formar una concentración final de P E G al 10%. La mezcla se agita suavemente a la temperatura del ambiente durante 30 minutos y se centrifuga a 5000 rpm durante media hora. Lo sobrenadado se decanta y el precipitado se lava en agua fría  
25 ( $2^{\circ}\text{C}$ ). Se lleva a cabo un lavado giratorio durante cinco minutos a 5000 revoluciones y a la temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Lo sobrenadado se decanta y el precipitado se disuelve en salina citratada. La solución clarificada se filtra usando un filtro Millipore de 293 mm como se ha descrito en el ejemplo 1. Este produc -



to líquido final puede ser congelado mediante congelación de cáscara, seguido de almacenamiento en refrigerador relámpago durante por lo menos 3 horas y, entonces, conservarse bajo condiciones de refrigeración corrientes, para uso ulterior en terapia hemofílica de la misma manera que el producto final del ejemplo 1.

EJEMPLO 3

Se repite el ejemplo 2 incluyendo la fase adicional de purificación de la fracción de AHF con resina de celulosa ECTEOLA de la manera siguiente.

REACTIVOS

Resina de celulosa ECTEOLA -

1. Mézclense 60 gm de NaOH con 150 ml de H<sub>2</sub>O
2. Déjese enfriar la mezcla
3. Coloquénse 60 gm de celulosa (polvo de celulosa Whatman CF 11) en un vaso picudo y mézclense concienzudamente con la solución de arriba de NaOH.
4. Déjese la mezcla reposar durante la noche (12 horas).
5. Al día siguiente, préparese una solución de 35 ml de trietanolamina y 60 ml de epiclorhidrina. Mézclense bien bajo una campana.
6. Agréguese esta solución rápidamente a la celulosa de arriba y mézclense bien. Colóquese el recipiente de reacción fuera de la corriente. (la reacción es exotérmica y alcanzará la temperatura de alrededor 100° C . La mezcla tomará color pardo en una a dos horas).
7. Enfriese la mezcla a la temperatura ambiente bajo campana.



8. Agréguese 350 ml de 2M NaCl en pequeñas porciones
9. Filtrese esta mezcla a través de un filtro de vidrio sinterizado, basto.
10. Lávese el precipitado dos veces con 500 ml de 1N NaOH. (Esto quita la decoloración profunda)
11. Hagase suspender el precipitado en 350 ml de 1N HCl en embudo de filtro. Aplíquese vacío.
12. Repítase la fase 11 con 250 ml de 1N NaOH.
13. Repítase la fase 11 con 250 ml 1N HCl.
14. Repítase la fase 11 con 250 ml de 1N NaOH
15. Transfiérase el precipitado a un vaso picudo de 3 litros
16. Agregúese 250 ml de 1N NaOH. Mézclese
17. Añádase agua destilada a la mezcla hasta llenar el vaso picudo; mézclese. Cúbrase y permítase reposar durante la noche.
18. Decántase lo que sobrenada
19. Agregúese agua al precipitado hasta llenar el vaso picudo y mézclese.
20. Lávese la mezcla en el filtro, con agua. (cuatro litros o más, hasta tener prueba negativa para álcali con cenolfataleina alcohólica de 1%)
21. Hágase un lavado final con dos porciones de 250 ml de etanol absoluto
22. Póngase en papel de filtro. Amásese y extiéndase, colocándolo para secar durante la noche.

Compensador de Cloruro

- 0,8% NaCl ( 8 gm/L)
- 0,02M Imidazole (1,36 gm/L)
- Ajustese el pH a 6,9 con 1N HCl



Compensador de lavado.-

0,5 M NaCl

0,02M Imidazole (1,36 gm/L)

Ajústese el pH a 6,9 con 1N HCl

5

En lugar de la resina de celulosa ECTEOLA, preparada como se ha dicho arriba, puede usarse una resina de celulosa ECTEOLA obtenible en el comercio que, primeramente, <sup>se</sup> somete a ciclo repetido con NaOH, por ejemplo, como de la manera siguiente.

10

Resina de Celulosa ECTEOLA Comercial de Ciclo Repetido.-

15

1. Mézclense 60 gramos de resina de celulosa ECTEOLA con 350 ml de 2M NaCl
2. Filtrese esta mezcla a través de un filtro de vidrio sinterizado, basto.
3. Lávese el precipitado dos veces con 500 ml de 1N NaOH.
4. Lávese una vez con 350 ml de 1N HCl
5. Lávese una vez con 250 ml de 1N NaOH
6. Lávese una vez con 250 ml de 1N HCl
7. Lávese una vez con 250 ml de 1N NaOH

20

8. Transfiérase el precipitado a un vaso picudo de tres litros y agréguese 250 ml de 1N NaOH; mézclese
9. Agreguése agua destilada a la mezcla hasta llenar el vaso picudo. Mézclese. Cúbrase y déjese reposar durante la noche.

25

10. Decántese el líquido; agréguese tres litros de agua al precipitado; mézclese. Filtrese.
11. Lávese el precipitado con agua hasta que la prueba de fenolftaleína resulto negativa.
12. Lávese el precipitado dos veces con 500 ml de EtOH absoluto

30



13. Séquese el precipitado, al aire, sobre papel de filtro.

PROCEDIMIENTO

5 Cuando el material de partida para la purificación con resina de celulosa ECTEOLA es el concentrado crioprecipitado de AHF o la fracción precipitada de polietileno glicol de AHF, la fracción AHF se disuelve primeramente en compensador de cloruro. Cuando el material de partida es la fracción precipitada de glicina de AHF, la fracción de AHF se somete a  
10 dialisis, primeramente, contra el compensador de cloruro durante una hora, para eliminar la glicina, y reducir su fuerza iónica. La purificación de la fracción AHF, condensada mediante técnica de columna con la resina de celulosa ECTEOLA preparada como se ha dicho arriba, se realiza como sigue:

15 La resina de celulosa ECTEOLA se equilibra durante la noche (12 horas) en una cámara a 5° C , mediante mezcla con compensador de cloruro en proporciones de 15 gm de resina para 600 ml de compensador. La lechada de resina resultante se vierte sobre una columna de entre 25,4 mm y 38,1 mm de  
20 diámetro y unos 46 cm de alto. Después de que el compensador haya descendido al nivel de la resina, la fracción de AHF se ajusta a dos y medio ml por minuto y la cantidad de fracción de AHF aplicada a una sola columna es de entre 1000 y 2500 unidades de AHF. (Una unidad de AHF es igual a la actividad de AHF en un cc de plasma sanguíneo humano normal) . Después  
25 de que el AHF ha sido aplicado a la columna, se emplea un lavado de 200 a 500 ml de compensador de cloruro a través de la resina. Cuando el compensador de cloruro desciende al nivel de la resina, el compensador de lavado se aplica a la columna. Lo lavado se recoge en porciones de 10 ml y se analiza  
30 para el fibrinógeno de proteína y para la actividad AHF.



5 Las porciones lavadas que tienen actividad AHF más activa se retienen y se estabilizan mediante la adición de 1% de albúmina. La solución estabilizada se filtra entonces, usando un filtro Milliporo de 293 ml como en el ejemplo 1. Un filtro de plata del mismo tamaño puede ser usado también en lugar del filtro Milliporo. Este producto líquido final puede, entonces, congelarse mediante congelación de cascarrilla seguido de almacenamiento en un congelador relámpago durante, al menos, tres horas y, entonces, se conserva bajo 10 condiciones ordinarias de refrigeración de modo igual al del producto final del ejemplo 1.

15 Puede idearse varias modificaciones y adaptaciones en la presente invención, después de haber leído las anteriores especificaciones y las reivindicaciones finales, por personas peritas en la materia, sin desbordar por ello el espíritu y alcance de la invención. Todas las variaciones y modificaciones tales quedan incluidas en el marco de la invención tal como se define en las reivindicaciones siguientes.

20

#### NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como propio y nuevo a favor de la firma BAXTER LABORATORIES INC., domiciliada en Morton Grove, Illinois (EE.UU.) lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

25

PRIMERA.- Procedimiento de preparación de un concentrado del factor antihemofílico denominado AHF, caracterizado en que comprende la mejora consistente en el fraccionamiento de un concentrado de crioprecipitado de AHF.



SEGUNDA.- Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que el concentrado de AHF posee alta potencia y estabilidad obtenida mediante el concentrado de crioprecipitado de AHF.

5 TERCERA.- Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que dicho fraccionamiento comprende precipitación con una solución acuosa de glicina que tiene una molaridad de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,8, seguida de recuperación del precipitado.

10 CUARTA.- Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que el fraccionamiento comprende dos sucesivas precipitaciones con polietileno glicol que posee un peso molecular de entre unos 200 y unos 20.000; la primera usando entre aproximadamente 3% y aproximadamente 4% de polietileno glicol, al peso, del concentrado de crioprecipitado de AHF, seguido de  
15 la recuperación de lo supernadado resultante; y la segunda con aproximadamente 10% de polietileno glicol al peso de lo sobrenadado, seguido de recuperación del precipitado resultante.

20 QUINTA.- Procedimiento según la reivindicación cuarta, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular promedio de, aproximadamente, 4000.

SEXTA.- Procedimiento según la reivindicación cuarta, caracterizado en que incluye la fase adicional de purificación con resina de celulosa ECTEOLA.

25 SEPTIMA.- Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizada en que el fraccionamiento comprende las fases sucesivas de precipitación y recuperación citadas en la reivindicación cuarta, seguidas de las fases de precipitación y recuperación citadas en la reivindicación tercera, en las cuales la solución  
30 acuosa de glicina tiene una molaridad de aproximadamente 1,8.



OCTAVA.- Procedimiento según la reivindicación séptima, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 4000.

5 NOVENA.- Procedimiento según la reivindicación séptima, caracterizado en que comprende la fase adicional de purificación con resina de celulosa ECTEOLA.

DECIMA.- Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que el fraccionamiento comprende <sup>las</sup> fases de precipitación y recuperación mencionadas en la reivindicación tercera, seguidas de las sucesivas fases de precipitación y recuperación mencionadas en la reivindicación cuarta.

10 UNDECIMA.- Procedimiento según la reivindicación décima, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular promedio de , aproximadamente, 4000.

15 DUODECIMA.- Procedimiento según la reivindicación décima caracterizado en que comprende la fase adicional de purificación con resina de celulosa ECTEOLA.

DECIMATERCERA.- " PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN CONCENTRADO DEL FACTOR ANTIHEMOFILICO (AHF, Factor VIII).

20 Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de diecinueve hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 2 Mayo 1968

25

F.A. de Baxter Laboratories Inc.  
Victor Gil Vega