

405938

18 A



P.- 51.042

HOE 71/B 011

405938

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. ² A 61 K

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE MATERIAL TROM-
BOPLASTICO"

(Clase Internacional G12k)

=====

31.5.72.

405938

18



Objeto del invento es un procedimiento para el aislamiento de material tromboplástico a partir de placenta humana, que encuentra utilización para mejorar la capacidad de coagulación de la sangre.

5 Ya es sabido que se puede obtener material tromboplástico a partir de cerebro humano seco por medio de extracción con cloroformo. Por causa del déficit del material de partida, no obstante, este procedimiento no entra en consideración para una producción a gran escala.

10 Es sabido además aislar mediante acetona y cloroformo material tromboplástico a partir de cerebros de conejo y de ganado vacuno. El rendimiento de los procedimientos descritos así como el grado de pureza y la eficacia de los preparados aislados, sin embargo, no pudieron proporcionar

15 satisfacción. Su actividad - también referida a la unidad de peso - es baja, y su administración provoca en muchos casos incompatibilidades.

Se ha encontrado ahora que se puede obtener un material tromboplástico especialmente eficaz mediante

20 tratamiento de por sí conocido de placentas humanas.

Tal como es sabido, la coagulación de la sangre es iniciada por los trombocitos. Las perturbaciones en la coagulación de la sangre aparecen debido a un déficit de trombocitos, tal como en la trombopenia o en una modificación de la función de los trombocitos, una

25
31.5.72.



llamada trombopatía, por ejemplo en el caso de una tromboastenia.

El material tromboplástico de acuerdo con el invento consiste en un líquido que es aislado a partir de placentas humanas por extracción con disolventes orgánicos. Hasta el momento no era sabido que el material tromboplástico se presenta en placentas y se puede recuperar a partir de éstas. Una ventaja especial del invento consiste en que se puede poner a disposición del médico un material homólogo. Un preparado con la actividad obtenida no ha sido descrito todavía hasta el momento.

El preparado de acuerdo con el invento ofrece la posibilidad de mejorar, mediante inyección intravenosa, la capacidad de coagulación de la sangre. Puede ser administrado como agente hemostático para detener la hemorragia después de operaciones, extracciones de dientes, etc., y en el caso de déficit de trombocitos, por ejemplo en el caso de la tromboastenia.

Para el aislamiento del material tromboplástico a partir de placentas se pueden aplicar los procedimientos habituales para la obtención de fracciones de lípidos a partir de tejidos, por ejemplo el procedimiento descrito en la memoria de patente alemana 820.787. Se logran resultados especialmente buenos si el material de placenta desmenuzado es sometido a extracción con un di

405938



solvente orgánico miscible con agua tal como acetona, se recoge el residuo en una mezcla de uno de tales disolventes y de un disolvente no miscible con agua, por ejemplo una mezcla de acetona/cloroformo, preferiblemente en la proporción volumétrica de 1:1 a 3:1, se desecha el material no disuelto, se concentra por evaporación la solución, se extrae con acetona en caliente (convenientemente varias veces), después de enfriamiento de los extractos eventualmente reunidos se recoge el sedimento resultante, se disuelve en cloroformo, se extrae por agitación con agua, a la que se ha añadido una pequeña cantidad de acetona, se concentra por evaporación, y se lleva al residuo a una forma apropiada para la administración intravenosa.

15 Para la primera extracción, que convenientemente se realiza con acetona, se utilizan 700-1400, preferiblemente aproximadamente 1000 ml de acetona por 1000 ml del material de placenta desmenuzado.

20 La solución concentrada por evaporación de la extracción con acetona-cloroformo es extraída en 150 - 500 ml, preferiblemente 330 ml de acetona (referido a 1000 ml de material de partida).

25 La actividad del preparado producido de acuerdo con el invento es determinada según el llamado ensayo de formación de plasmatomboquinasa. El principio

31.5.72.

405938



de este ensayo está basado en un método de dos fases, en el cual en una primera fase se forma plasmatomboquinasa con participación de iones calcio y de factores de coagulación que se pueden obtener en el comercio. En esta fase
5 el factor de trombocitos 3, presente normalmente, es reemplazado por el preparado producido de acuerdo con el invento. La actividad de la plasmatomboquinasa formada en esta primera fase es determinada en una segunda fase en plasma, que había sido centrifugado en alto grado y de
10 este modo había quedado pobre en trombocitos. En esta fase, a partir de la protrombina presente en el plasma normal se pone en libertad el fermento activo trombina, que de nuevo cataliza la transformación del fibrinógeno en fibrina. Debido a la formación de fibrina pasa a coagularse
15 el plasma. Este proceso se desarrolla en el espacio de 10 a 15 segundos. El acortamiento del tiempo de coagulación en algunos segundos indica una considerable mejora de la actividad del preparado a investigar.

Para el ensayo del material tromboplástico
20 preparado de acuerdo con el invento se mezcla plasma humano recientemente recogido con una suspensión de hidróxido de aluminio y se somete a centrifugación. Por medio de la adsorción con hidróxido de aluminio se eliminan ampliamente los factores de coagulación VII, IX y X, de manera que
25 el plasma contiene principalmente los factores VIII y V.
31.5.72.

405938



0,3 ml de este plasma previamente adsorbido, en la dilu-
ción de 1:5, son mezclados con otros 0,3 ml más de una
dilución de suero de 1:10 y con 0,3 ml de la sustancia a
ensayar. En lugar de las sustancias a ensayar, en el ensa-
5 yo de formación de tromboquinasa se añade usualmente la
misma cantidad de una suspensión de trombocitos humanos.
A continuación se añaden 0,3 ml de una solución de cloruro
de calcio M/40, se mezcla y se calienta a 37°C. A interva-
los, cada uno de un minuto, se recogen a partir de esta
10 carga de ensayo 0,1 ml, se mezclan con 0,1 ml de solución
de cloruro de calcio M/40 y se añaden a esta mezcla 0,1
ml de plasma de substrato. (El plasma de substrato es plas-
ma humano liberado totalmente de trombocitos, que se pue-
de obtener en el comercio). El tiempo de coagulación de es-
15 ta segunda carga es medido con uno de los métodos de labo-
ratorio usuales.

Un preparado producido de acuerdo con el
invento y un preparado que se puede obtener en el comercio,
producido de modo correspondiente a la memoria de patente
20 alemana 820.787, fueron comparados mutuamente con el ante-
rior ensayo. En este caso se obtuvieron los siguientes va-
lores:

9,5 segundos para el producto del procedimiento
13,0 segundos para el producto conocido (los valo-
res medidos están diseminados entre 12,5 y

25
31.5.72.

405938



13,5 segundos).

Otro procedimiento de ensayo más para la eficacia o actividad consiste en la determinación del llamado tiempo de veneno de serpiente Russel (Russel viper venom) (VSR). En este caso el factor de coagulación X que se encuentra en el plasma es activado mediante el veneno de las serpientes *Vipera russeli*. La forma activa del factor X se une con ayuda de iones calcio a material tromboplástico (lípidos). Con el complejo que resulta de este modo reacciona por adición además el factor V. El complejo de lípido - enzima así resultante desdobla luego la protrombina para formar trombina, que a su vez lleva a coagulación al fibrinógeno. Se determina el tiempo que transcurre entre la adición de cloruro de calcio al sistema descrito y la iniciación de la coagulación. Cuanto más activo es el material tromboplástico para la coagulación, tanto más intenso es el desdoblamiento de protrombina y tanto más cortos se hacen los tiempos. En la práctica se procede añadiendo el material tromboplástico en series de dilución de decenas a cantidades constantes de plasma humano y veneno de las serpientes *Vipera russeli*, manifestándose un mínimo de tiempo con una determinada dilución.

En lo que sigue se compara el lípido de placas preparado de acuerdo con el invento con un lí-

405938

18



5 pido que había sido preparado de acuerdo con el estado conocido de la técnica. Los dos mínimos de tiempo se encuentran con una dilución de 1:100. El mínimo de tiempo del lípido de placentas preparado de acuerdo con el inven-
to es de nuevo considerablemente menor que el del lípido del estado conocido de la técnica.

	Dilución	Lípidos de placentas	Lípido, preparado de acuerdo con el estado conocido de la técnica (●)
	Concentrado	105''	107''
10	1:10	47,5''	50''
	1:100	42''	49''
	1:1000	52''	57''
	1:10000	75''	82''

15 (●) (Memoria de patente alemana 820.787).

Ejemplo

20 Dos placentas humanas son molidas en estado congelado. 1000 ml del material que se ha licuado de este modo son agitados con 1000 ml de acetona durante una hora a 20°C y a continuación son filtrados. El filtrado es desechado. El residuo de filtración es agitado a 20°C durante 15 horas con 1500 ml de acetona y 500 ml de cloroformo, es filtrado y el filtrado es concentrado por evaporación bajo presión reducida entre 40 y 50°C. El residuo de lípido que resulta de este modo es calentado a ebullición

25
31.5.72

405938



dos veces con 330 ml de acetona. Los dos extractos son reunidos y enfriados a -20°C . De este modo precipita el lípido, que es aislado por decantación del disolvente, recogido en 25 ml de cloroformo, cubierto con 600 ml de agua y agitado durante 1 hora. En el embudo sacudidor la fase en cloroformo es separada del agua y es mezclada con 10 ml de una mezcla de una parte de acetona y una parte de agua y es agitado con un mezclador vibratorio durante 5 minutos. La suspensión que resulta de este modo es centrifugada durante 20 minutos con 5000 veces la fuerza de la gravedad, la capa que se recoge por la parte superior es retirada cuidadosamente y la solución remanente de cloroformo-lípido es concentrada por evaporación bajo presión reducida. El lípido liberado del cloroformo es recogido en 20 ml de tetrahidrofurano y es añadido gota a gota a 90 ml de una solución acuosa al 5% de fructosa de $40-45^{\circ}\text{C}$. A continuación el disolvente es eliminado en vacío a 40°C , el volumen es completado de nuevo con agua a 90 ml, la solución coloidal acuosa es ajustada con ácido clorhídrico 0,1 N a un valor de pH de 6,5 y es mantenida a 100°C durante una hora. Se obtiene una solución opalescente débilmente amarillenta, que en el ensayo de formación de tromboquinasa manifiesta un tiempo de coagulación de 9,5 segundos.

25
31.5.72.

La presente solicitud que corresponde a la

405938

18 AGO



presentada en la República Federal Alemana, el 24 de Agosto de 1971, bajo el Nº P 21 42 343.8, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

5 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:

10 1.- Procedimiento para el aislamiento de material tromboplástico caracterizado porque placentas humanas son tratadas de manera de por sí conocida para obtener componentes de lípidos.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se desmenuzan placentas humanas, se somete a extracción con un disolvente miscible con agua, se recoge el residuo en una mezcla de uno de tales disolventes y un disolvente no miscible con agua, se desecha el material no disuelto, se concentra por evaporación la solución, se extrae con acetona en caliente, después

19
31.5.72.

405938

13



de enfriamiento del extracto se recoge el sedimento,
se disuelve en cloroformo, se extrae por agitación con
agua, a la que se ha añadido una pequeña cantidad de
acetona, se concentra por evaporación, y se lleva al
5 residuo a una forma apropiada para la administración
intravenosa.

3.- Procedimiento para el aislamiento de
material tromboplástico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que
10 antecede y para los fines que se han especificado.


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

13 MAR. 1973

Madrid,

P.A.

Alberto de Elzaburu
Per Feder


GDS/MAL/10.3.73

- 11 -