

406199

30  
406199



P.- 51.696  
Mer/TrI-Swedish Patent  
Appln. No. 11350/1971

MEMORIA DESCRIPTIVA

|                       |
|-----------------------|
| Int. Cl.: <u>A61K</u> |
|-----------------------|

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de AKTIEBOLAGET KABI

entidad sueca

establecida en Lindhgensgatan 133, Estocolmo, Suecia

por: UN METODO DE AISLAR ANTITROMBINA A PARTIR DE MATERIAL  
ANIMAL (Clase Internacional A61k C12k)

21.8.72

- 1 -

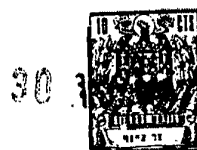


La presente invención se refiere a un método para el aislamiento de antitrombina a partir de sangre o productos sanguíneos, por adsorción sobre una matriz de gel que contiene hidrato de carbono sulfatado.

5           La coagulación de la sangre es un proceso complicado en el que están implicados cierto número de componentes. La formación de un coágulo puede ser inducida por un número de estímulos diferentes, siendo el más frecuente el daño mecánico de uno o varios vasos sanguíneos. La iniciación de la coagulación tiene lugar entonces parcialmente por activación por contacto de ciertos factores de la sangre, y parcialmente por activadores de los tejidos que escapan del sitio dañado. La agregación de coágulos sanguíneos, que tiene lugar simultáneamente, afecta también a  
10           la iniciación. Se inicia una cadena de reacciones que finalmente da como resultado la formación de un coágulo en el sitio dañado. Una de las últimas y más importantes etapas en la formación de un coágulo de fibrina es la acción de la trombina, una enzima formada en el proceso de coagulación, sobre fibrinógeno, con el que dos pequeñas fracciones peptídicas del fibrinógeno son disociadas, produciendo un fibrinógeno modificado, que después se aglutina rápidamente en un retículo, un coágulo.

15           Para regular la tendencia de la sangre a coagularse e impedir que una coagulación local se extienda y  
20           25           21.8.72

406199



5 cause una coagulación intravascular total, hay varias sustancias presentes en la sangre que ejercen un efecto inhibitor sobre la coagulación. Una de las más importantes es la antitrombina, una proteína que reacciona con la trombina y la desactiva. De este modo, la trombina desactivada ya no puede atacar al fibrinógeno, y es inhibida la formación de coágulos.

10 Se han observado niveles de antitrombina reducidos patológicamente en cierto número de condiciones, combinados con un mayor riesgo de trombosis, por ejemplo después de una operación de cirugía mayor. Hay razones para suponer que la terapia con antitrombina puede hacerse valiosa en el tratamiento de estos casos. Se han encontrado también niveles reducidos de antitrombina en relación con  
15 el uso de ciertas drogas esteroideas.

Hasta ahora, la antitrombina ha sido aislada sólo en cantidades en trazas, y por consiguiente es relativamente poco conocida. Los métodos adoptados hasta ahora han sido muy complicados y han dado rendimientos muy bajos,  
20 de 1-2 por ciento. El método que se describe más adelante permite la extracción de antitrombina en rendimientos de más del 90 por ciento.

25 En relación con los experimentos de la invención para aislar factores de coagulación a partir del plasma sanguíneo por adsorción sobre geles que contienen hidrato

21.8.72



de carbono sulfatado, se encontró inesperadamente que se  
unen factores específicos de coagulación a los geles en  
cuestión. La separación adicional del material por filtra-  
ción con gel permite el aislamiento de un componente con  
5 el peso molecular de aproximadamente 65.000, con una inhi-  
bición fuertemente pronunciada de la coagulación. Los es-  
tudios de esta proteína con técnicas físico-químicas e in-  
munológicas muestran su identidad con la antitrombina III  
anteriormente descrita. Los experimentos con elución por  
10 gradientes del gel de la columna muestran que puede obte-  
nerse directamente antitrombina separada adecuadamente de  
otras proteínas en el material de partida. Para obtener  
grandes cantidades de antitrombina ha demostrado ser ade-  
cuado adsorberla de la fracción IV de Cohn (método 6) por  
15 adición de gel a una disolución de esta fracción. Después  
de la adsorción, el gel puede separarse por filtración,  
lavarse y eluirse. Después de la filtración con gel del  
eluato sobre Sephadex<sup>®</sup> G150 (Pharmacia Fine Chemicals,  
Uppsala, Suecia) se obtiene una antitrombina completamen-  
20 te pura. Son ejemplos de geles adecuados para ser usados  
como adsorbentes: 1) sulfato de dextrano reticulado, 2)  
sulfato de dextrano reticulado-agarosa, 3) heparina reti-  
culada, 4) heparina reticulada-agarosa, y 5) sulfato de  
condroitina reticulado-agarosa. Los geles reticulados sim-  
25 ples 1) y 3) son preparados por adición de bromuro de cia-

21.8.72

406199

30



nógeno a una disolución del polisacárido. Ajustando el pH a aproximadamente 11 se efectúan enlaces reticulares entre las moléculas y la formación del gel. Los geles mixtos 2), 4) y 5) son obtenidos añadiendo el polisacárido sulfatado a un gel de agarosa (Sephadex<sup>®</sup> 4B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), seguido de la adición de bromuro de cianógeno a pH 11. Estos tipos de geles son más fáciles de manejar y producen mayores caudales que los geles uniformes.

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar la invención

Ejemplo 1

A una disolución de 100 ml de sulfato de dextrano (20 mg/ml) se añadieron 5 g de BrCN. El pH fué aumentado después a 11 con NaOH 5M durante 7 min., y la mezcla se dejó reposar durante la noche bajo agitación. Se formó una pasta de gel granular blanco. La pasta fué introducida como relleno en una pequeña columna de 5 mm de diámetro x 8 cm y fué equilibrada con tampón de TRIS 0,02 M, citrato 0,01 M y ClNa 0,15 M, de pH 8,5. Se hicieron pasar 2 ml de plasma normal a través de la columna. Después del paso a través de la columna, el plasma había perdido su coagulabilidad. La columna fué lavada primero con el tampón original y después eluída aumentando escalonadamente la concentración de sal hasta ser 1M en ClNa. El eluato contenía

21.8.72



material que después de una diálisis frente a tampón de fosfato prolongaba el tiempo de coagulación del plasma normal, después de su recalcificación, de 3 min. a 45 min. El análisis inmunológico demuestra la presencia de antitrombina y algunas lipoproteínas en el eluato.

#### Ejemplo 2

Adsorción a partir de plasma con gel de sulfato de dextrano reticulado-agarosa. Elución por gradiente.

El sulfato de dextrano fué preparado mezclando una disolución de 30 ml de sulfato de dextrano (15 mg/ml), 50 ml de agarosa polimerizada en perla al 4 por ciento, y 1 g de BrCN, a pH 11. La mezcla se dejó permanecer durante 7 min. con agitación, y el pH fué mantenido por adición continua de NaOH. Después se detuvo la adición de álcali y el pH descendió a 8,5 en 5 min. La agitación fué continuada a temperatura ambiente durante la noche y el gel fué lavado después. Se rellenó una columna con el sulfato de dextrano-agarosa así obtenido. En la operación de adsorción se hicieron pasar a través de la columna 3 ml de plasma normal mezclado 1:1 con el tampón (TRIS 0,02 M, citrato 0,01 M, ClNa 0,15 M, pH 8,5). Después del paso a través de la columna, el eluato fué concentrado a un volumen de 3 ml y sometido a ensayo para determinar su capacidad de coagulación. Durante el paso a través de la columna, el plasma había perdido su capacidad para coagular, y estaba despro-

25  
21.8.72



visto de, entre otros, los factores de coagulación VIII y IX. El material adsorbido fué desorbido con TRIS 0,02 M y citrato 0,01 M, pH 7,3, en un gradiente de sal a partir de ClNa 0,15 M. El eluato correspondía a aproximadamente 2 por ciento del material de partida, y constaba principalmente de dos componentes, una fracción de lipoproteína de un tipo pre-beta, y antitrombina III. La identificación fué efectuada por técnicas inmunológicas y físico-químicas.

#### Ejemplo 3

Adsorción a partir de plasma con gel de sulfato de dextrano reticulado-agarosa. Elución escalonada. Filtración con gel.

La adsorción sobre gel de sulfato de dextrano-agarosa se efectuó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La desorción se realizó en una etapa con TRIS 0,02 M, citrato de Na 0,01 M, ClNa 1 M, de pH 7,3). El producto de desorción fué concentrado y sometido a filtración por gel sobre Sephadex<sup>®</sup> G150 en tampón fisiológico de fosfato. Se obtuvo antitrombina pura en una fracción bien separada de la fracción de lipoproteína.

#### Ejemplo 4

Adsorción a partir de plasma con gel de heparina reticulada-agarosa.

La heparina-agarosa fué preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2 para el sulfato de dextrano-agarosa.

21.8.72

406199

30



En lugar del sulfato de dextrano se usaron 30 ml de una disolución de heparina (5000 UI/ml). El gel fué introducido como relleno en una columna y el experimento fué efectuado como se ha indicado en el Ejemplo 2. Los resultados obtenidos fueron similares a los dados en el Ejemplo 2.

5

Ejemplo 5

Adsorción, sobre gel de sulfato de dextrano-agarosa, de material proteínico del plasma de la fracción IV de Cohn (método 6). Elución escalonada. Filtración con gel.

10

Usando métodos inmunológicos puede mostrarse que hay presente antitrombina en la fracción IV de Cohn (método 6). 135 g de una pasta de la fracción IV fueron disueltos en 4 l de tampón de adsorción, y se añadieron 500 ml de gel de sulfato de dextrano-agarosa. La mezcla fué agitada lentamente durante 1 hora con enfriamiento al mismo tiempo, y después se decantó la disolución y se lavó el gel con tampón de adsorción. El gel fué introducido como relleno en una columna cambiadora de iones, y eluído aumentando la concentración de ClNa del tampón de TRIS de pH 7,2 de un modo escalonado (0,5 M, 1 M, 1,5 M). El eluato, que contenía lipoproteína y antitrombina fué concentrado por ultrafiltración, y purificado posteriormente por filtración con gel sobre Sephadex<sup>®</sup> G150. La identificación y los controles de pureza fueron efectuados por técnicas inmunológicas y físico-químicas.

15

20

25

21.8.72

406199

30 A



Ejemplo 6

Mezclando 250 mg de sulfato de condroitina VI,  
40 ml de agarosa polimerizada en perla al 4 por ciento,  
y 1 g de BrCN a pH 11, se preparó gel de sulfato de con-  
droitina-agarosa. La mezcla se dejó reposar a pH 11 duran-  
te 7 min. El pH fué mantenido por adición continua de diso-  
lución de NaOH. Sólo se necesitó una cantidad muy peque-  
ña de álcali, y al cabo de 7 min. el pH fué cuidadosamen-  
te reducido a 8,5 por adición de ácido acético. La agita-  
ción a pH 8,5 fué continuada a temperatura ambiente duran-  
te la noche, después de lo cual el gel fué lavado. Se re-  
llenó una columna con el material de gel y, bajo las mis-  
mas condiciones descritas anteriormente, se hicieron pa-  
sar a través de la columna 3 ml de plasma normal diluído  
1:1, después de lo cual pudo eluirse antitrombina del  
gel por elución con el mismo tampón de elución que en el  
Ejemplo 1.

La presente solicitud, que corresponde a la pre-  
sentada en Suecia, el 8 de Septiembre de 1.971, bajo el  
Nº 11350/1971 se acoge a los beneficios del Artículo 51  
del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

21.8.72

406199



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. Un método de aislar antitrombina a partir de material animal, que comprende usar un hidrato de carbono sulfatado como agente de adsorción.

2. Un método según la reivindicación anterior, que comprende unir un hidrato de carbono sulfatado a una matriz, o hacerlo además insoluble.

15 3. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende usar un polisacárido sulfatado como agente de adsorción.

20 4. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende usar polisacáridos sulfatados reticulados con bromuro de cianógeno, tales como sulfato de dextrano, dextrano-agarosa ó heparina-agarosa, como agentes de adsorción.

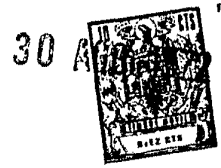
5. Un método de aislar antitrombina a partir de material animal.

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

21.8.72



406199



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

Madrid, 30 AGO. 1972

P.A.

5

Alberto de Eizaburu  
Por Poder.

21.8.72  
MSG

- 11 -

