

409794

409794

P.- 52.885³¹



Cutter 30

F.e 17-2-75

Int. Cl.²:

A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA por 20 años

a nombre de CUTTER LABORATORIES, INC.

entidad norteamericana

establecida en Fourth and Parker Streets, Berkeley,
California 94710, Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN CONCENTRADO
LIOFILIZADO ESTABLE AL ALMACENAMIENTO DERIVADO DE PLAS
MA HUMANO".

(Clase Internacional C12k)

409794

31



Esta invención se refiere a componentes de coagulación de la sangre y en general tiene por objeto la provisión de una composición purificada de componentes de coagulación de la sangre terapéuticamente útiles, y a un método para producir tales componentes a partir de mate-
5 riales que pueden adquirirse fácilmente.

Se estima que hay más de 100.000 casos de hemofilia congénita en los Estados Unidos. De éstos, aproximadamente 20.000 son casos de hemofilia B, estando la san-
10 gre de tales pacientes o totalmente desprovista de componente de tromboplastina plasmática o siendo gravemente deficiente en componente de tromboplastina plasmática. Por consiguiente la enfermedad se presenta con grados de gravedad variables, que requieren en cualquier caso tratamien-
15 to terapéutico, desde cada semana hasta una o dos veces al año. Los casos totalmente deficitarios necesitan una terapia de reemplazamiento una vez a la semana; los casos parcialmente deficitarios requieren tratamiento terapéutico solo cuando tiene lugar hemorragia, que puede ser tan esca-
20 sa como una vez al año. Las hemorragias en casos congénitos parcialmente deficitarios son ocasionadas, en general, por una susceptibilidad adquirida temporalmente más bien que por herida solo. La inyección intravenosa de una canti-
25 dad suficientemente grande de plasma fresco, o de una cantidad equivalente de sangre fresca, corrige temporalmente

409794



el defecto de un paciente deficitario. El efecto be-
neficioso a menudo dura dos o tres semanas, aun cuan-
do el defecto de coagulación, medido mediante ensayos
in vitro en la sangre del paciente, aparece mejorado
5 durante sólo dos o tres días. Tal terapia con plasma
fresco o sangre fresca es eficaz pero tiene varios in-
convenientes graves: (1) necesita poder disponerse con
facilidad de una gran cantidad de plasma fresco; (2)
necesita hospitalización para la administración del plas-
10 ma; (3) una gran mayoría de los pacientes llegan a sen-
sibilizarse a infusiones repetidas de sangre o plasma y
en último lugar se tropieza con reacciones de transfu-
sión mortales; (4) en el mejor de los casos el plasma só-
lo puede aliviar parcialmente la deficiencia; y (5) el
15 tratamiento prolongado o la cirugía no es posible debi-
do a las grandes cantidades de sangre o plasma que se ne-
cesitan que pueden ocasionar edema agudo y mortal.

Varios investigadores apreciaron que mezclar
sangre de determinados pacientes hemofílicos podría dar
20 como resultado la corrección mutua del defecto de coagu-
lación de cada sangre. La interpretación de estos descu-
brimientos fue hecha eventualmente por Aggeler y colabo-
radores [Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 79 : 692-696 (1952)]
y S.G. White y col. [Blood 8: 101-124 (1953)]. Estos inves-
25 tigadores, estudiando un paciente masculino con una diate

409794



5 sis hemorrágica grave asociada con un tiempo de coagu-
lación prolongado que era clínicamente indistinguible
de la hemofilia clásica, postularon la existencia de
un nuevo factor de coagulación. Aggeler y col. recono-
10 ciendo que el nuevo factor era un precursor de la trom-
boplastina, le dieron el nombre de Componente de Trom-
boplastina Plasmática (CTP). El trabajo fue confirmado
por Biggs y col. [Brit. Med. J. 2: 1378-1382 (1952)] en
Inglaterra, quienes le dieron el nombre de Factor de Na-
15 vidad (Christmas Factor), y por Soulier y Larrieu [New.
Eng. J. Med. 249: 547-553 (1953)] en Francia, quienes le
denominaron Factor Antihemofílico B. Este factor se desig-
na en la actualidad oficialmente como Factor IX. El papel
que juega el Factor IX, así como también los Factores II,
15 VII y X, es bien conocido en la técnica anterior.

En colaboración con Aggeler y col. se efectuó
la primera preparación de CTP fraccionada [Revue d'
Hematologie, 9: 447-453 (1954)]. El CTP fue adsorbido so-
bre sulfato de bario desde una solución de Fracción de
20 Cohn IV y se eluyó con citrato sódico 0,34 M. Los rendi-
mientos fueron muy pequeños y la actividad in vivo des-
pués de la infusión fue sólo la cuarta parte de la predi-
cha a partir de valoraciones in vitro mediante un ensayo
de consumo de protrombina.

20 Más tarde, en colaboración con Aggeler y col.,

409794



fue desarrollado un procedimiento mediante el cual se adsorbía GTP en sulfato de bario desde plasma anticoagulado con AEDT, se eluía con una solución tampón de cloruro sódico-citrato sódico y se purificaba adicionalmente por fraccionamiento con etanol frío. Esta preparación fué utilizada clínicamente con resultados excelentes [Aggeler, P.M y col. Trans. 6º Congreso Sociedad Internacional de Hematología. Grune & Stratton, N.Y. pag. 490-497 (1958)]. El procedimiento fue publicado más tarde en detalle, y se apuntó que el procedimiento nunca se había comercializado debido a que la Fracción de Proteína Plasmática y Albúmina obtenida como subproductos, estaban contaminadas con cantidades potencialmente peligrosas de bario [Hink, J.H. y Johnson, F.F., The Hemophilies Ch. 18, página 156, editado por Brinkhous, Univ. of North Carolina Press (1964)]. Biggs y col. en Inglaterra [Brit. J. Haematol. 7:349-364 (1961)] y Janiak y Soulier [Thromb. et Diath. Haemorr. 8: 406-424 (1962)] en Francia, prepararon más tarde el Factor IX mediante un procedimiento semejante, sustituyendo el sulfato de bario por fosfato tricálcico. Sin embargo, siempre tuvo lugar la formación espontánea de trombina y siempre fue necesario añadir heparina, tanto durante como después del tratamiento, para neutralizar la trombina, potencialmente peligrosa.

409794



Tullis y col. [New Eng. J. Med. 273:
667-674 (1965)] han preparado y estudiado una frac-
ción de plasma algo semejante, a la que denominan
"complejo de protrombina". En el procedimiento de
5 Tullis se adsorbió plasma tratado con resina de in-
tercambio iónico en DEAE-celulosa, se eluyó con fos-
fato-NaCl aumentando el gradiente de NaCl, se read-
sorbió en DEAE-celulosa, y se eluyó de nuevo. La elu-
ción fue efectuada con una solución tampón de fosfato
10 sódico-cloruro sódico estabilizada con AEDT. En la re-
ferencia se describen estudios clínicos sobre el "com-
plejo de protrombina", pero no se encuentran disponi-
bles otros datos que caractericen al complejo.

La preponderancia de la sangre tomada y dis-
15 ponible generalmente, para las transfusiones, se prote-
ge de la coagulación por tratamiento con un anticoagulan-
te de citrato. Tal sangre puede utilizarse sólo durante
un período de tiempo limitado. Una vez expira este tiem-
po limitado, esta sangre debe desecharse o puede hacerse
20 utilizable para su fraccionamiento en ciertos componentes
útiles. En realidad, la fuente principal de sangre total
convertida en plasma para su fraccionamiento procede de
sangre caducada que ha estado protegida de la coagulación
por citrato. Por consiguiente, es importante que los pro-
25 cedimientos de fraccionamiento de plasma, como por ejem-

409794



5 plo para obtener un concentrado que contenga Factor IX, estén dirigidos hacia sangre preservada, anticoagulada con citrato. Un objeto de esta invención es que el procedimiento para preparar el concentrado de esta invención comienza con plasma tomado de sangre anticoagulada con citrato.

10 Asimismo es importante que tales concentrados no contengan trombina ya que la inyección de trombina en el hombre puede considerarse muy peligrosa. Aun cuando es posible neutralizar la actividad de la trombina con heparina, sería preferible, en primer lugar, que no hubiera trombina. La heparina es indeseable en un concentrado que contiene Factor IX debido a que también es potencialmente peligrosa para el paciente y debido a que
15 ocasiona dificultades en la valoración de los factores de coagulación en el concentrado. Al administrar un concentrado que contiene Factor IX se necesita un control constante del estado de coagulación del paciente, y la presencia de heparina no sólo complicaría este procedimiento de ensayo, sino que haría inseguros los resultados
20 que pudieran obtenerse. Un objeto de esta invención es que el concentrado está libre tanto de trombina como de heparina.

25 Un objeto adicional de esta invención es proporcionar un concentrado que comprende los componentes de coa

409794



5 gulación II, VII, IX y X en proporciones esencialmente iguales a las encontradas en el plasma, libre todavía de la forma activada del Factor X, reduciendo con ello el riesgo de coagulación intravascular por precipitación.

10 Otro objeto de esta invención es proporcionar un concentrado libre de la actividad anti-complemento que frecuentemente está asociada a las globulinas del plasma y que podría hacer muy peligrosa la administración intravenosa.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un producto muy puro mediante adsorción selectiva de componentes activos y selectividad posterior por elución fraccionada.

15 Otros objetos y ventajas de la invención surgirán de la descripción que sigue de realizaciones preferidas de la misma.

20 Según esta invención se produce un concentrado liofilizado, estable en el almacenamiento, que procede de plasma humano, para controlar la hemorragia en hemofilia y otros casos de deficiencia de uno o más de los Factores II, VII, IX y X, desprovisto de heparina, trombina, la forma activada del Factor X, actividad depresora y actividad anti-complemento, y que contiene los Factores de coagulación
25 II, VII, IX y X en forma no activada, en proporciones sus-

409794

31 ENE 1973



tancialmente iguales a las del plasma humano, y que
posee una potencia reconstituida de Factor IX de al
menos aproximadamente 2.000 por cien de la del plas-
ma normal y una actividad específica de Factor IX de
5 al menos aproximadamente 0,5 unidades clínicas, por
miligramo de proteína y una vida media biológica de
Factor IX después de la infusión de unas 20-50 horas,
mediante las etapas de aplicar plasma humano tratado
con citrato, sin modificar, o una fracción del mismo
10 que contiene la totalidad de los Factores de coagulación
II, VII, IX y X, sobre una resina de intercambio iónico
que posee grupos débilmente básicos que ejercen atracción
sobre iones de polaridad opuesta, y adsorber en ella di-
chos componentes de coagulación del plasma; eluir selec-
15 tivamente la resina con una solución tampón volátil que
tiene un pH comprendido de aproximadamente 7,3 y 8,2 y
molaridad creciente; separar la fracción de eluato que
contiene los componentes de coagulación; congelar la frac-
ción de eluato separada y eliminar el tampón volátil de
20 ésta, liofilizando la fracción congelada.

Aun cuando puede emplearse como material de
partida para el procedimiento de esta invención plasma
humano total tratado con citrato, o cualquier fracción
del mismo que contenga la totalidad de los Factores de
25 coagulación II, VII, IX y X, el material de partida pre

409794



ferido es Supernatant I, Método Cohn 6. Véase
"Encyclopedia of Chem. Techn." Kirk & Othmer, Vol. 2,
páginas 10-13 (1948), Interscience Enc., Inc, N.Y.,
Cohn y col., J.Am. Chem. Soc., 68, 459 (1946).

5 Las resinas de intercambio iónico empleadas
en el procedimiento de esta invención son las conocidas
resinas de intercambio iónico dispersables en agua o en
soluciones tampón, que tienen grupos débilmente básicos
que ejercen atracción sobre los iones de polaridad opues
10 ta. Son ejemplos de las mismas celulosa y resinas de in
tercambio iónico de polisacáridos que tienen tales grupos,
incluyendo las alcohol(inferior)amino-alcohol(inferior)ce
lulosa, dietilaminoetil(DEAE)celulosa y trietilaminoetil-
(TEAE)celulosa y dietilaminoetil-Sephadex. Tales resinas
15 tienen generalmente una capacidad de adsorción relativa
mente baja, por ejemplo, de aproximadamente 1,0 a 5 milie-
quivalentes por gramo. Por ejemplo la DEAE celulosa tiene
una capacidad de 1,0 miliequivalente/g (peso seco); el
DEAE Sephadex, $3,5 \pm 0,5$ miliequivalentes/g.; y el TEAE
20 Sephadex, 0,55 a 0,75 miliequivalentes/g. Otra de tales
resinas es la Whatman DEAE celulosa-52, microgranular (W
and R Balston Ltd., Hardstone, Kent, England). La resina
de intercambio iónico de partida preferida es el DEAE
Sephadex, es decir, una resina de intercambio iónico que
25 consiste, esencialmente, en una cadena de dextrana reticu

409794



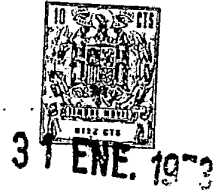
1973

lada que posee grupos dietilaminoetilo unidos a las uni
dades de glucosa de las cadenas de polisacáricos. Esta
resina adquirible comercialmente se suministra en los Es
tados Unidos por Pharmacia Fine Chemicals, Inc.,
5 Piscataway, N.J.

Una solución se aplica del plasma de partida a
la resina de intercambio iónico seleccionada, adsorbiendo
en ella los Factores de coagulación II, VII, IX y X, jun-
to con una pequeña fracción de las otras proteínas plasmá
10 ticas. Las proteínas no adsorbidas pueden ser recogidas y
devueltas al proceso de fraccionamiento del plasma, no des
perdiciando de este modo nada del plasma de partida. La re
sina se lava después con una solución tampón volátil de mo
laridad relativamente baja, por ejemplo, hasta 0,3 M, has-
15 ta que la resina queda exenta por lavado de proteínas no
adsorbidas. La resina se eluye fraccionadamente con una so
lución de un tampón volátil de molaridad creciente y un pH,
de preferencia sustancialmente constante, comprendido entre
7,3 -8,2. El complejo de coagulación de esta invención se
20 eluye a una molaridad comprendida entre 0,3 M y 0,75 M. El
tampón se separa después del eluato por liofilización.

La relación de resina de intercambio iónico, por
ejemplo, DEAE Sephadex respecto al volumen de plasma de par
tida, por ejemplo, Supernatant I, puede variar en un inter-
25 valo amplio. El uso de una proporción elevada de resina de

409794



tercambio iónico da como resultado un rendimiento superior del complejo de coagulación de pureza inferior con una mayor pérdida de otras proteínas plasmáticas recuperables normalmente en etapas subsiguientes. El uso de una proporción inferior de resina de intercambio iónico da como resultado un rendimiento más bajo de producto de un grado de pureza superior.

Aun cuando el DEAE Sephadex es la resina de intercambio iónico aniónica preferida, es evidente que pueden emplearse asimismo otros adsorbentes aniónicos que tengan características de adsorción semejantes.

La etapa de elución con solución tampón volátil, con gradiente de concentración del tampón, es sumamente importante. Se prefiere el bicarbonato amónico pero pueden emplearse también otros tampones volátiles, por ejemplo, acetato amónico, aproximadamente al mismo pH. La selectividad única obtenida por el uso de la elución con gradiente creciente de sal, combinada con la volatilidad del tampón, son aspectos críticos del procedimiento por las razones siguientes:

1. Siendo el tampón una sal volátil, es completamente eliminada del producto desecado, resultando de este modo una preparación de proteína completamente desprovista de sal. Esto tiene la ventaja de que la preparación clínica final puede ajustarse fácilmente a isotonicidad.

409794



Asimismo es importante para la estabilidad del producto.

2. La recuperación de una proteína desprovista de sal elimina la necesidad de procedimientos extensos de eliminación de sal tales como diálisis, filtración con
5 gel, ultrafiltración, etc. De este modo, se hace más práctica, la operación de gran escala llevada a cabo comercialmente.

3. Se encontró que el bicarbonato amónico ofrece selectividad en la elución de las proteínas unidas,
10 permitiendo la fácil separación de impurezas indeseables tales como la ceruloplasmina. Como resultado, los componentes deseados se eluyen en un estado de pureza superior al que puede conseguirse con soluciones de elución convencionales.

15 Se prefiere un intervalo de pH de aproximadamente 7,0 - 7,8 para las etapas de elución. Si bien pueden utilizarse valores de pH superiores, hasta de 8,2, los pH superiores contribuyen a la inestabilidad del producto.

20 Las condiciones anteriores hacen posible además el fraccionamiento.

25 Las etapas de disolución de la proteína desecada a su concentración preferida, la naturaleza del tampón electrolítico, y la filtración son todas etapas normales que pueden ser variadas mediante cualquiera familiarizado con la técnica.

409794

31



El producto que resulta del procedimiento descrito es un producto liofilizado que contiene los Factores humanos II, VII, IX y X en un tampón electro_lítico adecuado, por ejemplo, un tampón de cloruro só_dico-citrato só_dico. El producto está desprovisto de trombina, actividad de tromboplastina, actividad anti-complemento y actividad depresora. Tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 0,5 unidades de Factor IX por mg de proteína. Se define la unidad de Factor IX como la actividad de Factor IX contenida en un ml de plasma agrupado promedio y fresco. Los resultados de análisis se expresan en términos de un patrón de referencia liofilizado que contiene 0,7 unidades por ml, por reconstitución.

15

Análisis

Análisis in vitro de la actividad del Factor IX

El análisis se basó en la técnica del tiempo de tromboplastina parcial de Langdell, Wagner y Brinkhous [J. Lab. Clin. Med. 41 : 637-647 (1953)] y el método del tiempo de coagulación de caolín de Proctor y Rapaport [Am. J. Clin. Path. 36:212-219 (1961)]. El Factor de plaqueta 3 fue suministrado por una suspensión de cefalina. La activación de contacto superficial máxima fue conseguida con un polvo de Celite. Todos los otros factores de coagulación (excepto el Factor IX) fueron suministrados por

25

409794



un substrato que comprendía plasma de un paciente gra-
vemente deficitario en Factor IX mezclado con plasma de
vacuno adsorbido en sulfato de bario. La determinación
cuantitativa de una muestra desconocida fue hecha compa-
5 rando su tiempo de coagulación en el ensayo, con el con-
seguido mediante diluciones de un patrón normal.

Reactivos

- 1.- Solución de cloruro cálcico. CaCl_2 0,05 M
- 2.- Solución tampón de veronal
10 2,94 g de barbital sódico
 3,67 g de cloruro sódico
 105 ml de ácido clorhídrico 0,1 N
 agua destilada cantidad suficiente para 500 ml
- 3.- Celite. Auxiliar de Filtración para análisis, de Johns
15 Manville.
- 4.- Suspensión de Cefalina. Preparada de tromboplastina de
 cerebro de conejo según Bell y Alton [Nature 174 :
 880-881 (1954)].
- 5.- Reactivo de Cefalina-Celite. Se mezclaron volúmenes
20 iguales de Suspensión de Cefalina diluida 1:50 en so-
 lución amortiguadora de veronal a pH $7,3 \pm 0,1$ y Celi-
 te, 1,0 g, suspendida en 5 ml de solución de NaCl al
 0,9%.
- 6.- Líquido de dilución I (LD I)
25 50 ml. de citrato sódico 0,1 M

409794



300 ml de cloruro sódico 0,15 M

7.- Líquido de dilución II (LD II)

20 ml de Solución amortiguadora de veronal

60 ml de NaCl 0,15 M

5 8.- Plasma de vacuno tratado con sulfato de bario. Se adsorbió plasma de vacuno tratado con oxalato con 100 mg/ml de sulfato de bario y se guardó en alícuotas pequeñas a -20°C .

9.- Plasma substrato

10 Se mezcló 1 parte de plasma tratado con citrato, procedente de un paciente gravemente deficitario en Factor IX (guardado en alícuotas pequeñas a -20°C), con 3 partes de plasma de vacuno tratado con sulfato de bario.

15 10.- Patrón de referencia

Patrón de referencia de plasma liofilizado Nº 788-27.
Potencia asignada = 0,7 unidades por ml.

El reactivo de cefalina-celite se volvió a suspender completamente antes de su uso. Los reactivos substratos fueron descongelados con agitación constante en un baño de agua a 37°C , después se mezclaron en la relación de una parte de plasma de paciente respecto a tres partes de plasma de vacuno con BaSO_4 . Después se mantuvo en un baño de hielo en fusión con todos los otros reactivos excepto la solución de calcio, que se colocó en un ba

409794



ño de agua a 37°C. Un plasma patrón de referencia se diluyó 1/10, 1/50, 1/100, etc., con los líquidos de dilución I y II, según el método de Hjort y col. [J. Lab. Clin. Med. 46: 89-97 (1955)]. Las muestras desconocidas fueron ensayadas a diluciones adecuadas. Un 5 décimo de ml de cefalina-celite resuspendido, 0,1 ml de plasma substrato y 0,1 ml de muestra desconocida o plasma patrón fueron colocados en un tubo de vidrio en el baño de agua a 37°C y se puso en funcionamiento un 10 cronómetro. La mezcla se agitó suavemente durante el período de incubación de tres minutos para mantener el celite en suspensión. Al término de tres minutos se añadió 0,1 ml de la solución de CaCl_2 y se puso en funcionamiento un segundo cronómetro. El tubo fue inclinado hasta que 15 tuvo lugar la coagulación. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado y se promediaron los tiempos de coagulación.

El plasma patrón de referencia se ensayó con cada conjunto de muestras desconocidas. Se construyó una 20 gráfica sobre papel de escala logarítmica doble colocando los tiempos de coagulación en ordenadas y las concentraciones de plasma en abscisas. Fueron representados los tiempos de coagulación de las diversas diluciones del plasma patrón de referencia y se trazó la mejor línea posible a través de los puntos. Las concentraciones de Ca 25

409794



tor IX de las muestras desconocidas fueron determinadas por referencia a esta gráfica. Los valores obtenidos para las diversas concentraciones de la muestra desconocida fueron promediados.

5 Análisis in vitro del Factor II (Protrombina)

El análisis del Factor II fue un típico análisis de Owren de una etapa. Los resultados se expresan como unidades por ml, definiéndose la unidad de protrombina como la actividad de protrombina contenida en un ml de un patrón de plasma congelado.

10 Análisis in vitro de tromboplastina y trombina

La tromboplastina y la trombina fueron estimadas simultáneamente, mediante un ensayo típico de tiempo de recalcificación. Se comparó el tiempo de coagulación en segundos de la muestra y de un testigo como sigue:

15 Muestra 0,1 ml de muestra (a diversas diluciones)
0,1 ml de plasma tratado con citrato
0,1 ml de CaCl_2 0,05 M

20 Testigo 0,1 ml de NaCl 0,15 M
0,1 ml de Plasma tratado con citrato
0,1 ml de CaCl_2 0,05 M

25 La "muestra" se ensayó a varias diluciones con agua destilada porque altas concentraciones de electrolitos neutros inhiben la coagulación debida a tromboplastina o trombina.

409794



1:100 utilizando fenol como conservador.

5.-Complemento

Reconstituido según intrucciones, con diluyente suministrado.

5 6.-Hematíes sensibilizados

Se calentó durante 15-30 minutos a 37°C antes del uso.

2 unidades/0,2 ml. vol. Hemolisina
2% de Hematíes de oveja

{ volúmenes
iguales

10

Valoración

1. Hemolisina

Diluciones que se duplican hasta 1:32 de la solución de reserva al 1:100 utilizando como diluyente CF salino.

15

0,2 ml de diluciones de hemolisina

0,2 ml de Complemento (1:30 con CF salino)

{ Incubado 30
min. a 37°C.

0,2 ml de Hematíes al 2%

0,5 ml de CF salino

20

La dilución más alta de hemolisina que proporciona lisis completa = 1 unidad.

Cantidad usada en el análisis = 2 unidades/0,2 ml.vol.

Testigos (incubados 30 min. a 37°C)

(1) 0,2 ml de hemolisina (sin diluir)

25

0,2 ml de hematíes al 2%

409794



- 0,7 ml de CF salino
(2) 0,2 ml de Complemento (1:30)
0,2 ml de hematíes al 2%
0,7 ml de CF salino
5 (3) 0,2 ml de hematíes al 2%
0,9 ml de CF salino

Todos los testi
gos deben ser ne
gativos (sin lisis)

2. Complemento

Tubo	Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	
		Complemento 1:30								
10		(ml) 0,12	0,11	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	
		CF salino (ml)	0,48	0,49	0,50	0,51	0,52	0,53	0,54	0,55

Incúbense las diluciones 30 min a 37°C.

Añádanse 0,4 ml de hematíes sensibilizados a cada una

Incúbese 30 min a 37°C

- 15 Cantidad mínimo C' que dá lisis completa = unidad
"exacta"

Cantidad más alta siguiente = unidad "completa"

Cantidad usada en el análisis = 2 unidades "completas"/

0,2 ml vol.

- 20 Testigo (incubado 30 min a 37°C)

0,4 ml de hematíes sensibilizados Debe ser negativo

0,6 ml de CF salino (sin lisis)

Ensayo

0,2 ml de Muestra (diluciones que se duplican con CF
25 salino como diluyente)

409794



0,2 ml de CF salino

0,2 ml de C' (2 unidades)

Las diluciones se incubaron 1 hora a 37°C

5 Se añadió a cada una 0,4 ml de hematíes sensibilizados.

Se incubó 30 min a 37°C

Punto final = Muestra de dilución más alta que exhibe al menos 50% de lisis.

Testigos (incubados 30 min a 37°C)

10 (1) 0,2 ml de muestra (dilución más baja usada)
0,4 ml de hematíes sensibilizados Debe ser negativo (sin lisis)

0,4 ml de CF salino

(2) 0,2 ml C' (2 unidades)

0,4 ml de hematíes sensibilizados Debe ser negativo (sin lisis)

15 0,4 ml de CF salino

(3) 0,4 ml de hematíes sensibilizados Debe ser negativo (sin lisis)

0,6 ml de CF salino

Actividad Depresora

20 Se midió la actividad depresora mediante el Ensayo de sustancias depresoras descrito en la USP XVII, página 843.

Las propiedades de diversas tandas del concentrado de factores de coagulación, obtenidas según el procedimiento de esta invención se indican en la Tabla I

25

409794

31 ENE 1970

TABLA I

ENSAYO

RESULTADOS

	<u>Tanda No</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
Factor IX	480 unidades	540 unidades	500 unidades	550 unidades	550 unidades
Factor II	700 unidades	640 unidades	510 unidades	370 unidades	370 unidades
Factor VII	380 unidades	500 unidades	480 unidades	570 unidades	570 unidades
Factor X	1100 unidades	500 unidades	470 unidades	570 unidades	570 unidades
Proteína	962 mg.	606 mg.	484 mg.	340 mg.	340 mg.
Actividad Especifica	0,5	0,89	1,03	1,6	1,6
pH	6,9	6,8	6,8	7,2	7,2
Na ⁺	242 mEq./L.	237mEq./L.	240 mEq./L.	237 mEq./L.	237 mEq./L.
Cl ⁻	90 mEq./L.	94 mEq./L.	88 mEq./L.	87,1 mEq./L.	87,1 mEq./L.
Citrato (C ₆ H ₅ O ₇) ⁻³	51 mEq./L.	48 mEq./L.	51 mEq./L.	50,2 mEq./L.	50,2 mEq./L.
Trombina-Tromboplastina	Nada	Nada	Nada	Nada	Nada
Sustancias depresoras	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa

Expresados como valores por vial, ó como valores por unidad de volumen una vez reconstituidos con 20 ml.

409794



Se preparó una tanda de complejo de coagulación de esta invención según el procedimiento descrito en esta Memoria. Los ensayos mostraron que la tanda estaba desprovista de actividad depresora, trombina y tromboplastina, así como de actividad anti-complemento. La tanda se guardó liofilizada, a temperatura ambiente se volvió a ensayar tres meses y seis meses más tarde. No se encontró actividad depresora, trombina o tromboplastina.

10 Para demostrar la estabilidad del complejo de esta invención, se colocó un gran número de frascos de cada una de tres tandas en tres niveles de temperatura diferentes y se analizaron a intervalos apropiados. En la Tabla II se presentan como ejemplo los datos de esta
15 bilidad de la tanda PR 2240 (1,8% de humedad), después de reconstituir cada frasco con 20 ml de agua.

20

25

24-1-73

409794



TABLA II

	Fecha de Valoración	Tiempo transcurrido	Unidades de Factor IX por ml.		
			50°C	Temp. ambiente	40°C
5	9/2/68	Inicial	33,6	33,6	33,6
	19/3/68	5 semanas	----	----	34,6
	19/4/68	9 semanas	----	35,4	29,0
	9/5/68	3 semanas	28,0	----	----
	20/5/68	3-1/2 meses	----	----	28,7
10	19/6/68	4 meses	34,2	32,6	32,6
	22/7/68	5 meses	----	----	21,8
	8/8/68	6 meses	35,0	----	----

Se demostró la potencia del complejo de esta in vención reconstituyendo una porción de una tanda preparada según el procedimiento descrito en esta Memoria y analizándole para comprobar los factores de coagulación. Los resultados, expresados como tantos por ciento de plasma nor mal, se muestran en la Tabla III

TABLA III

20	II	2550%
	VII	2400%
	IX	2500%
	X	2350%

(Actividad específica de Factor IX : 1,03 unidades/mg. de proteína) .

25

409794



El complejo de esta invención fue ensayado para determinar sustancias depresoras según los requisitos de esta valoración en la USP XVII y cumplía todos estos requisitos. Los resultados se muestran en la Tabla IV

5

TABLA IV

	Dosis	Cambio en la Presión Arterial Media
	0,05 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 35
10	0,10 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 50
	0,15 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 55
	0,10 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 50
	0,10 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 50
	Muestra de la invención 0,2 cc/kg i.v.	- 5
15	0,10 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 40
	Muestra de la invención 0,2 cc/kg. i.v.	- 5
	0,10 mcg/kg de Histamina(Base libre) i.v.	- 40
	(La muestra de la invención se diluyó a 3,0 cc).	

El análisis de Tromboplastina-trombina anteriormente descrito proporcionó los resultados siguientes al ensayar una muestra del complejo de esta invención:

25



409794

TABLA V

<u>Muestra ensayada</u>	<u>Tiempo de coagulación (seg)</u>
Solución salina (Testigo)	135
Muestra de la invención sin diluir	180
Muestra de la invención diluida 1:3	135
Muestra de la invención diluida 1:10	135

El fallo de la muestra de la invención para mejorar el tiempo de coagulación de plasma humano normal es prueba de la ausencia de trombina, tromboplastina y la forma activada del Factor X.

Resultados Clínicos

Se han llevado a cabo análisis en el hombre con el complejo de coagulación de esta invención utilizando pacientes deficitarios en el Factor IX y con pacientes deficitarios en el Factor VII. Los datos de coagulación de uno de estos análisis en el hombre, llevado a cabo con un paciente deficitario en el Factor IX se presentan en la Tabla VI. Durante las 48 horas siguientes a la administración del producto de esta invención que contenía 2030 unidades Factor IX, no hubo anomalías en la presión sanguínea, pulso, temperatura y respiración. Además, dos administraciones del complejo de coagulación de esta invención al mismo paciente separadas 13 días, no pusieron de manifiesto

409794



sensibilización o antigenicidad.

TABLA VI

Dosis : 290 ml (2030 unidades) se comenzó 11:10 AM
se terminó 12:25 PM

Muestra No	Fecha	Hora	Tiempo Transcurrido		Factores de coagu- lación				
			Horas	Minutos	II	VII %	IX	X	
0	22-2-67	11:00am	0	0	75	64	1,0	95	Factor IX predicho = 56,4%
1		12:45pm	0	20	144	165	54,2	200	
2		1:10	0	45	136	122	49,2	213	
3		2:20	1	55	123	83	46,0	193	
4		3:30	3	5	105	87	44,5	170	
5		4:25	4	00	105	103	48,5	176	
6		5:30	5	5	110	75	39,2	185	
7		8:05	7	40	107	75	43,5	183	
8		10:30	10	5	106	62	29,0	183	
9	23-2-67	2:00am	13	35	94	48	24,3	125	
10		8:35	20	10	100	40	13,4	148	
11		11:20	22	55	100	33	13,1	151	
12		2:30pm	26	5	79	34	10,4	147	
13		4:35	28	10	101	35	10,8	132	
14	24-2-67	10:05am	45	40	99	55	9,1	139	
15		1:00pm	48	35	101	51	9,6	138	
16		4:30	52	5	106	58	9,2	141	
17	25-2-67	10:15am	69	50	95	37	7,0	117	
18	26-2-67	11:00am	94	35	92	39	5,9	121	
19	27-2-67	11:14am	118	50	85	42	3,35	97	
20	28-2-67	2:10pm	143	45	80	47	2,9	98	

La curva de desaparición del Factor IX después de la infusión es típicamente bifásica; el T 1/2 del primer componente es de 7-1/2 horas; el T 1/2 del segundo componente es de 47 horas. La vida media del Factor IX después de la infusión en diferentes pacientes varía desde aproximadamente 20 horas hasta aproximadamente 50 horas.

Se han recogido análisis de coagulación fidedignos para

409794



los cuatro componentes de coagulación después de la administración de ocho tandas diferentes a cada uno de dos o más pacientes. En aquellos pacientes que podrían considerarse medianamente normales (incluyendo
5 pacientes con hemorragia, pero excluyendo aquellos que muestran fibrinolisis o volúmenes de plasma que cambian ampliamente), la administración de 2,2 unidades por kilo de peso da como resultado un aumento de aproximadamente 4 por ciento en los Factores II, VII,
10 IX y X. El aumento después de la infusión del Factor X es, en general, un poco más alto que el de los otros tres factores.

El producto de esta invención ha sido usado por 14 investigadores clínicos en el tratamiento de
15 situaciones de urgencia en que estaban implicados 65 pacientes. Estos eran pacientes que tenían una deficiencia congénita permanente de cualquiera de los Factores VII, IX y X, o que tenían una deficiencia adquirida temporalmente de los cuatro factores (II, VII, IX y X); y que o
20 bien eran muy reactivos respecto a plasma o no podían tolerar el volumen de plasma que pudiera necesitarse; y que sufrían un trastorno hemorrágico grave o que requerían protección mientras soportaban un tratamiento quirúrgico de emergencia importante.

25 El modo de administrar el producto de esta inven

40979A

31 ENE 1973



ción será fácilmente conocido por los médicos. Muy generalmente, el producto liofilizado se reconstituye con agua para inyección para preparar una solución isotónica que se inyecta por vía intravenosa al paciente.

5

EJEMPLO

Se adsorbe Supernatant I, Método Cohn 6, procedente del plasma normal tratado con citrato, sobre DEAE Sephadex recientemente equilibrado en una cantidad de 10 g (peso húmedo) por litro de Supernatant I, a una temperatura comprendida entre 0º y -3ºC. Se devuelve el Supernatant I agotado al proceso de fraccionamiento del plasma para la precipitación de la Fracción Cohn II + III.

Se lava la resina DEAE Sephadex con bicarbonato amónico 0,2 M a pH 7,0 - 7,8 hasta que no se eluye más proteína y se desechan los lavados. Después, se lava la resina DEAE Sephadex con bicarbonato amónico 0,3 M, a pH 7,0 - 7,8 hasta que no se eluye más proteína. Con este lavado se eluye ceruloplasmina azul, que se desecha. Seguidamente, se eluye la resina DEAE Sephadex con bicarbonato amónico 0,75 M a pH 7,6-7,8 hasta que se eluye la fracción de Factor IX junto con los Factores II, VII y X. Se congela y liofiliza este eluato. El bicarbonato amónico sublima dejando un polvo proteínico desprovisto de sal equivalente a unos 350 mg por litro de Supernatant I. Se analiza para determinar el Factor IX y se guarda en un recipiente

409794



te a prueba de humedad a 5°C o inferior.

Este producto puede convertirse en una mezcla seca que contiene un amortiguador electrolítico, adecuada para administrar por via intravenosa, como sigue:

5 Se disuelve lentamente el polvo proteínico liofilizado en un diluyente de citrato sódico 0,05 M y cloruro sódico 0,088 M hasta una concentración final de 25 unidades de Factor IX por ml. Según se va disolviendo el polvo se mantiene el pH en 7,0 - 7,5 mediante adiciones de hidróxido sódico 1 N. Se ajusta el pH final a 7,3 ± 0,1. Se esteriliza la solución por filtración a través de un filtro de membrana, estéril, de porosidad 0,2 micras y se llenan asépticamente porciones convenientes del mismo en viales estériles, se congela y liofiliza. Se almacena a 5°C.

10 Para administrar al hombre, se redisuelve asépticamente el contenido de uno de los viales anteriores en agua para inyección. Alternativamente, el producto que procede de la etapa de sublimación puede llenarse en condiciones estériles y liofilizarse para obtener un producto desprovisto de sal. En este caso, se reconstituye con un diluyente isotónico adecuado antes de inyectar en el hombre.

15 El procedimiento anterior describe los detalles que son preferidos en la actualidad. Sin embargo, pueden

409794



hacerse muchas variaciones sin apartarse de los principios generales de la invención.

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento para la producción de un concentrado liofilizado estable al almacenamiento, derivado de plasma humano, para combatir la hemorragia en la hemofilia y otros casos de deficiencia de uno o más de los Factores II, VII, IX y X, mediante la adsorción de una fracción de plasma humano que contiene un factor de coagulación, sobre una resina de intercambio iónico y elución de la misma, caracterizado por aplicar plasma humano sin modificar o una fracción del mismo que contiene la totalidad de los Factores de coagulación II, VII, IX y X sobre una resina de intercambio iónico que consiste esencialmente en una resina de intercambio aniónico que posee grupos dietilaminoetilo o grupos debilmente básicos semejantes que ejercen atracción sobre los iones de polaridad opuesta y adsorber en ella dichos componentes de coagulación del plasma; eluir selectivamente la resina con una solución de

25

mte

31 ENE 1978



409794

un tampón volátil que tiene un pH comprendido entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 8,2, y que aumenta de molaridad; separar la fracción de eluato que contiene los componentes de coagulación; congelar la fracción de eluato separada y separar de ésta el tampón volátil por liofilización de la fracción congelada.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la resina de intercambio iónico está constituida por cadenas de dextrana reticuladas, con grupos dietilaminoetilo enlazados a las unidades de glucosa de las cadenas de polisacárido.

3ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque el tampón volátil es bicarbonato amónico.

4ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª, 2ª ó 3ª, caracterizado porque el plasma de partida es Supernatant I, Método Cohn 6.

5ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª, 2ª, 3ª ó 4ª, caracterizado porque la elución de la fracción que contiene los factores de coagulación se efectúa a una molaridad de aproximadamente 0,75 M y a un pH de aproximadamente 7,6-7,8.

6ª.- Un procedimiento según la reivindicación 4ª, caracterizado porque la resina de intercambio iónico que contiene los componentes de coagulación adsorbidos se

MLC

409794

31 ENE 1973



lava primeramente, para librarla de ceruloplasmina,
con solución tampón de hasta 0,3 M antes de eluir
los factores de coagulación.

5 7ª.- Un procedimiento para la producción
de un concentrado liofilizado estable al almacenamien
to derivado de plasma humano.

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

10 Esta Memoria consta de treinta y cuatro ho-
jas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 ENE. 1973

P.A.

15

Alberto de Elizaburu
For Pedro

20

25

ME

24-1-73 CAL.