

414823



F.C. 28-II-75

Int. Cl.: <u>A 61K</u>

PATENTE DE INVENCION

Que por veinte años se solicita a favor de BAXTER LABORATORIES, INC., de nacionalidad estadounidense, con domicilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos), y que ha de recaer sobre: "MÉTODO PARA MEJORAR EL RENDIMIENTO DE UN FACTOR ANTI-HEMOFILICO OBTENIDO A PARTIR DE PLASMA SANGUINEO Y DE FRACCIONES DE PLASMA".

5

=====

Memoria Descriptiva

El registro de la Patente de Invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un Método para mejorar el rendimiento de un Factor Anti-hemofílico obtenido a partir de plasma sanguíneo y de fracciones de plasma, conforme se describe a continuación .

10

414823



5 El invento está relacionado con un método para preparar un concentrado de Factor Anti-hemofílico (AHF, Factor VIII). Más particularmente, el invento está relacionado con un método para mejorar la cantidad de AHF, obtenida a partir de plasma sanguíneo y de fracciones de plasma.

10 El proceso de la coagulación de la sangre es una actividad biológica complicada en la que entra en juego la interacción de varias sustancias que se encuentran en la sangre completa normal. Es sabido que algunos factores asociados con el mecanismo de coagulación de la sangre están ausentes o son seriamente deficientes en algunos individuos. Por ejemplo, es sabido que la hemofilia clásica (hemofilia A) es una enfermedad carencial producida por la ausencia de AHF (Factor VIII). En los individuos que padecen de hemofilia congénita, conocida bajo el nombre de hemofilia B, la sangre presenta una carencia de tromboplastina del plasma (PTC, Factor IX). Varios otros factores que son importantes en los mecanismos de coagulación, son Factores II, VII y X.

20 Hasta años recientes, el tratamiento de los hemófilos consistía en hacer al paciente una transfusión de sangre completa o de plasma de sangre. Sin embargo, una práctica médica más acertada requiere que, cada vez que sea posible, se administren al paciente solamente aquellos componentes de la sangre de los cuales carece. Debido a la escasez universal de sangre, es igualmente ventajoso fraccionar la sangre en sus varios componentes, de modo que puedan ser utilizados de acuerdo con las necesidades de cada tratamiento.

25 Se conocen varios métodos de fraccionamiento de la sangre y del plasma sanguíneo en sus componentes o concentrados separados. Los trabajos de Edwin Cohn y sus asociados en la Universidad de Harvard, para el desarrollo del método de fraccionamiento por alcohol son particularmente notables. Con relación particular a la

30



producción de AHF, las recientes Patentes de los Estados Unidos N° 3.631.018 y 3.652.530 ilustran métodos mejorados para obtener un concentrado altamente purificado de este Factor.

5 En el trabajo de investigación de Wagner, Thelin, Brinkhous y otros, relacionados con la producción de AHF, se ha demostrado que la presencia de protrombina (Factor II) y su complejo de factores asociados era perjudicial para la estabilidad del Factor VIII, tanto a largo plazo como a plazo corto. El tratamiento usual para evitar esta dificultad consistía en retirar el complejo pro-

10 trombina por medio de varios agentes, tales como hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio, carbonato de bario, sulfato de bario, rivanol (6,9 - diamino 2-etoxiacridina lactato), resina de cambio iónico IRC-50 (XE-64-rivanol) y ester etílico de glicina.

15 Aunque los agentes mencionados más arriba son generalmente eficaces, se han presentado varios inconvenientes importantes en su utilización en aplicaciones clínicas. Desde luego, el factor VIII queda estabilizado mediante la utilización de estos agentes, ya que la eliminación de la protrombina no permite que se forme trombina. La trombina es responsable principalmente de la degradación del Factor VIII, como lo han observado Kisker, Tromb. Diath. Haemorrhagica Vol. 17, pag. 381 (1967) y Penick y Brinkhous, Amer. J. Med. Sciences, Vol. 232, Pag. 434 (1956). Por ejemplo, en la preparación del Factor VIII con amino ácidos alifáticos, el método original de Wagner y otros utilizaba hidróxido de alumi-

20 nio para, (1) reducir la degradación del Factor VIII empleando manipulaciones de concentración, y (2) aumentar la estabilidad a largo plazo, tanto después de la liofilización como después de la reconstitución. The Hemophilias, K. M. Brinkhous, Ed., International, Symposium, Washington D.C., Univ. de North Carolina Press, Pag. 81 (1964).

25

30

414823



Sin embargo, la inclusión de cantidades insignificantes de aluminio ha sido considerada como clínicamente peligrosa.

5 Se creyó que la llegada de la crioprecipitación y la producción en una sola etapa de concentrados de actividad relativamente elevada iba a evitar la necesidad de utilizar cualquier medio de eliminación del complejo protrombina ( Pool y sus colaboradores, Nature, Vol. 203, Pag. 312, 1964). Sin embargo, en la práctica, se demostró que el rendimiento de AHF variaba mucho con un coeficiente de variación que podía alcanzar o incluso superar el  
10 50% con relación a los valores medios observados.

Por tanto, un objeto del invento consiste en proporcionar un método mejorado para preparar un concentrado de Factor antihemofílico (AHF, Factor VIII).

15 Otro objeto del invento consiste en proporcionar un método para mejorar la cantidad de AHF obtenida del plasma sanguíneo y de fracciones de plasma.

Otros objetos y ventajas del invento podrán ser reconocidos por los peritos en la materia después de leer la descripción del mismo.

20 En resumen, el invento consiste en añadir heparina al medio acuoso que contiene el plasma sanguíneo o la fracción de plasma, que se fracciona a continuación para obtener un concentrado de AHF.

25 El invento se entenderá probablemente de manera más clara haciendo referencia al dibujo adjunto.

30 La figura del dibujo es un diagrama que representa el mecanismo de coagulación de la sangre. Los números romanos representan los varios Factores de coagulación de la sangre. Sin embargo queda entendido que este diagrama representa solamente una hipótesis de trabajo basada en los conocimientos actuales, y los invento

414823



res no tienen intención de limitarse a esta hipótesis o de ceñirse a ella.

Tal y como se ha dicho más arriba, en la práctica de preparación de AHF se ha obtenido un rendimiento de AHF muy ravigable. Cuanto más tiempo exigen las manipulaciones de la concentración, tanto más bajo es el rendimiento de AHF. Las pérdidas de rendimiento han sido algo mejoradas mediante un cuidado escrupuloso aportado en la eliminación de las células de sangre. Estos resultados pueden ser explicados haciendo referencia al diagrama de coagulación del dibujo adjunto. El mecanismo de retroacción representado por medio de líneas de puntos presenta un interés particular; este mecanismo indica la acción del Factor IIa (trombina) sobre el Factor V (proacelerina), y el Factor VIII (AHF). La acción consiste en dos partes: Las acciones de VIII y V son, (1) en primer lugar reforzadas por la estructura terciaria alterada y a continuación (2) reducidas para detener una coagulación excesiva que podría conducir a dificultades de la circulación.

En el diagrama de coagulación, se ve que la extracción de los Factoras II, VII, X y IX (complejo protrombina) eliminaría el mecanismo de retroacción ya que no existiría Factor II capaz de producir Factor IIa. La observación realizada por los inventores del presente invento, del hecho de que el plasma exento de células permite obtener la concentración con producción de cantidades de AHF más importantes, puede también ser explicada por el diagrama de coagulación, ya que no se produce tromboplastina y por tanto la coagulación no puede iniciarse.

De acuerdo con el invento, se ha comprobado ahora que el rendimiento de producción de AHF puede ser aumentado añadiendo heparina durante el fraccionamiento. Los inventores han observado que contrariamente a la práctica anterior, en que no se usaba hepa-



rina, cuando se emplea heparina (1) la contaminación debida a las células, procedente por ejemplo del proceso de fraccionamiento, no da lugar a rendimientos más bajos, (2) la contaminación debida a los tejidos, del tipo que se produce durante la administración intravenosa, no produce reducción del rendimiento, (3) el alargamiento de la duración del proceso no reduce el rendimiento, y (4) la estabilidad reconstituída es más elevada que la de los concentrados de plasma no heparinizados en un Factor del orden de 30 veces, por lo menos. Por tanto, en la práctica del invento es innecesario retirar el complejo protrombina para conseguir la estabilidad de los comcentrados de Factor VIII y se subsanan las pérdidas usuales de rendimiento debidas a la contaminación producida por las células y los tejidos o por la larga duración del proceso.

La cantidad de heparina utilizada en la práctica del invento durante el fraccionado de AHF puede variar dentro de límites razonables. Se han comprobado que una concentración de aproximadamente una unidad de heparina por ml. de la solución de plasma o de fracción de plasma representa un valor óptimo. Las concentraciones superiores a 10 unidades por ml., aproximadamente, deben ser evitadas como innecesarias y peligrosas. También son eficaces concentraciones de aproximadamente 0,01 unidar por ml. La gama preferida está incluida entre 0,01 y 10 unidades por ml., aproximadamente. Una unidad de heparina se define aquí como una unidad de la U.S.P. (Farmacopea de los EE.UU.). La unidad U.S.P. de heparina es la cantidad que impide la coagulación de 1,0 ml. de plasma de oveja citratado durante 1 hora después de la adición de 0,2 ml. de una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1%. Según se utiliza aquí el término "heparina" incluye también la sal sódica de heparina, prefiriéndose dicha última substancia en razón de su solubilidad en el agua.

El invento descrito aquí ha demostrado su utilidad en va-

414823



rios procedimientos de preparación de concentrados de AHF y es aplicable a cualquier plasma o cualquier fracción de plasma que contenga AHF en mezcla con cualquiera de los Factores del complejo protrombina. Por ejemplo, se ha adaptado a métodos de fraccionamiento de AHF (1) a partir de plasma por precipitación con glicina, (2) a partir de crioprecipitado por precipitación con glicina, (3) a partir de crioprecipitado mediante precipitación por polietileno glicol, (4) a partir de crioprecipitado por precipitación con polietileno glicol y glicina, (5) a partir de crioprecipitado, (6) a partir de plasma y (7) a partir de crioprecipitado por precipitación con polietileno glicol y glicina, seguida por cromatografía "Ecteola".

Un método preferido de preparación de AHF al cual se presenta el invento es el método descrito en la Patente de los Estados Unidos Nº 3.631.018, en el cual se utilizan polietileno glicol (PEG) y glicina para fraccionar un crioprecipitado de concentrado de AHF. Por tanto, en el ejemplo 4 de dicha Patente, en la fase en la cual el crioprecipitado se disuelve en una solución salina de glicina citratada, se añade aproximadamente una unidad de heparina por cada ml. de la solución. Después de precipitación con polietileno glicol con una concentración de 10%, se trata de nuevo el precipitado re-disuelto para que contenga aproximadamente una unidad de heparina por ml. de la solución debido a la pérdida de heparina durante el fraccionamiento con polietileno glicol al 10%. La heparina puede ser añadida convenientemente mediante incorporación en la solución salina citratada o en la solución salina de glicina citratada utilizada para disolver los respectivos precipitados.

Los ejemplos siguientes permitirán ilustrar más completamente la invención, aunque se entiende que ésta no se limita a estos ejemplos.

78  
414823



Ejemplo 1

Un concentrado estable de AHF humano muy activo se produce con un elevado rendimiento de la siguiente manera:

Agentes reactivos

5 Solución salina citratada - una parte de citrato sódico de 0,1 mol para cuatro partes en peso de solución salina al 0,9%.

Solución salina de glicina citratada - se añade a la solución salina citratada preparada más arriba una cantidad de glicina suficiente para obtener una solución de glicina de 0,1 mol.

10 Agua de lavado tamponada - se añade al agua destilada una cantidad igual a 1/100 de su volumen, de citrato tamponado que se prepara añadiendo citrato de sodio de 0,5 mol a ácido cítrico de 0,5 mol para obtener un pH de 6,88.

15 Heparina - se utiliza material calidad Farmacopea de los Estados Unidos ("Lipo - hepin" - inyección de heparina sódica, acuosa).

Acido acético - preparado en soluciones acuosas normales 1,0 y 0,1.

20 Glicina - preparada en soluciones acuosas de 1,3 y de 1,8 mol.

Procedimiento

25 El plasma de sangre humana se recibe congelado (a una temperatura inferior a 4°C) de un centro de donantes. El plasma se coloca en marmitas de Pfaudler, y mientras se mantiene a una temperatura incluida entre -20°C y -40°C, se centrifuga por circulación  
30 continúa o mediante centrifugación en cubetas. Se añade al crioprecipitado una solución salina de glicina citratada que contenga una unidad de heparina por ml., siendo la cantidad la décima parte del volumen de plasma que representa el crioprecipitado. La disolución se realiza mezclando el crioprecipitado y la solución salina de

414823



glicina citratada en un ambiente caliente ( temperatura normal del local, no superior a 30°C).

5 El pH del crioprecipitado se ajusta en 6,5, con ácido acético normal 0,1. El polietileno glicol 4000 (peso molecular medio de 4000 aproximadamente) se añade a la solución para que la concentración de PEG sea de 3,5% aproximadamente. Se agita suavemente la mezcla a la temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se centrifuga durante 15 minutos a 5.000 rpm. La sustancia flotante se decanta y se ajusta su pH en 6,88 con hidróxido

10 sódico normal 0,1. Se añade una cantidad suplementaria de PEG 4000 a la solución para que la concentración final de PEG sea de 10% aproximadamente. Se agita suavemente la mezcla a la temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifuga a 5000 rpm durante media hora. La sustancia flotante se decanta y se desecha. El precipitado se lava en agua fría (2°C) y a continuación se hace un

15 lavado giratorio durante 5 minutos a 5000 rpm., bajo una temperatura de -4°C. Se decanta la sustancia flotante y el precipitado se disuelve de nuevo en una solución salina de glicina citratada que contenga una unidad de heparina por ml. De nuevo, la cantidad de

20 solución redisuelta es igual aproximadamente a la décima parte del volumen de plasma que el precipitado representa.

El precipitado redisuuelto se ajusta a un pH de 6,88 con ácido acético normal 0,1 y se precipita de nuevo con glicina acuosa de 1,8 mol. Se añade durante esta fase de precipitación una

25 cantidad de glicina suficiente para que la masa molar de la mezcla sea de 1,8 con relación a la glicina. La mezcla se agita suavemente durante 45 a 60 minutos a una temperatura incluida entre 2°C y 10°C, y a continuación se centrifuga por circulación continua o por centrifugación en cubetas. El precipitado resultante se recoge y se lava suavemente con agua de lavado tamponada y se redisuel

30 ve en una solución salina citratada. Se clarifica la solución



por filtración utilizando un filtro Millipore de 293 mm. (membranas utilizadas: 1,2 micrones, 0,45 micron y 0,3 micron).

5 A continuación se congela el producto líquido por congelación en estantes (-60°C) y se almacena en un congelador rápido (-20°C a -30°C) durante 3 horas por lo menos.

10 Se repitió el proceso descrito más arriba salvo que no se añadió heparina a la solución salina de glicina citratada utilizada para disolver el crioprecipitado inicial o para disolver el precipitado procedente del fraccionamiento con PEG al 10% o en cualquier otro punto del fraccionamiento.

Se repitieron ambos procedimientos anteriores con y sin adición de heparina.

La tabla siguiente indica los resultados de estas cuatro tandas de fraccionamiento.

Rendimiento de AHF %

15

Procedimiento utilizado	% de rendimiento de AHF obtenido por crioprecipitación del plasma inicial	Producto final Rendimiento de AHF % Obtenido a partir del plasma inicial.	% obtenido a partir de la fase criogénica	Volumen total de plasma inicial
Sin heparina	35%	13,6%	38%	6000 Litros
Con heparina	35%	17%	49%	300 Litros
Sin heparina	32%	12,5%	39%	6000 Litros
20 Con heparina	33%	17%	52%	300 Litros

En la tabla, se ve que el rendimiento final de AHF cuando se utilizaba heparina era de 17% mientras que el rendimiento sin heparina estaba incluido entre 12,5% y 13,6%. Por tanto, la adición de heparina ha aumentado el rendimiento en una cantidad incluida entre

414823



25 y 35% respecto al proceso en que no se utilizó heparina. Cuando se divide el rendimiento final de AHF por el rendimiento de AHF crioprecipitado, se ve que el rendimiento del proceso ha sido mejorado desde una cantidad incluida entre 38 y 39% sin adición de heparina hasta una cantidad incluida entre 49 y 52% con adición de heparina.

Cuando en lugar de PEG 4000, se utiliza una cantidad equivalente de PEG 6000, en el ejemplo anterior, se obtienen resultados substancialmente similares.

10 Ejemplo 2

Se repitió el proceso del Ejemplo 1 hasta la fase de re-suspensión del crioprecipitado inicial en solución salina de glicina citratada, con o sin heparina en la solución. En estos dos concentrados de crioprecipitado de AHF, el rendimiento final de AHF ha sido de 34% sin utilización de heparina y de 41% con utilización de heparina. Esto equivale a una mejora del rendimiento del 21%.

Ejemplo 3

Se repitió el proceso del Ejemplo 2 salvo que los concentrados crioprecipitados, tanto con como sin heparina, se liofilizaron y reconstituyeron con agua, dejándolos a la temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas. La muestra heparinizada conservó el 98% de su actividad inicial AHF antes del periodo de estancia mientras que la muestra no heparinizada conservó solamente el 72% de su actividad AHF inicial.

Los peritos en la materia, después de leer la descripción que antecede y las reivindicaciones adjuntas, podrán idear varios otros ejemplos y modificaciones a los ejemplos que anteceden, sin alejarse del espíritu y del alcance del invento. Todos estos ejem-

414823



plos y modificaciones suplementarios quedan incluidos en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Los términos en que se ha redactado esta memoria, deberán ser tomados siempre en sentido amplio, no limitativo.

5

NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de BAXTER LABORATORIES, INC., con domicilio en Morton Grove/ Illinois (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones;

10

1ª.- Método para mejorar el rendimiento de un Factor anti-hemofílico obtenido a partir de plasma sanguíneo y de fracciones de plasma, caracterizado en que incluye la adición de 0,01 a 10 unidades, aproximadamente, de heparina, a dicho plasma o a dicha fracción de plasma por cada ml. de solución del mismo.

15

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la fracción de plasma es un concentrado crioprecipitado de AHF.

20

3ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la fracción de plasma es un concentrado crioprecipitado de AHF que se fracciona ulteriormente con polietileno glicol y glicina.

25

4ª.- Método según la reivindicación 3ª, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular medio de 4000 aproximadamente.

5ª.- Método según la reivindicación 3ª, caracterizado en que el concentrado crioprecipitado se precipita con una cantidad de polietileno glicol incluida entre 3% y 4% aproximadamente, se precipita la substancia flotante resultante con polietileno glicol al 10% aproximadamente y se fracciona a continuación la

- 1 474829



substancia flotante resultante con glicina.

6ª.- Método según la reivindicación 5ª, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular medio de 4000 aproximadamente.

5 7ª.- Método según la reivindicación 5, caracterizado en que la glicina tiene una masa molar de 1,8 aproximadamente.

8ª.- Método según la reivindicación 5ª, caracterizado en que el polietileno glicol tiene un peso molecular medio de 4000 aproximadamente y la glicina tiene una masa molar de 1,8 aproximadamente.

10

9ª.- "METODO PARA MEJORAR EL RENDIMIENTO DE UN FACTOR ANTI-HEMOFILICO OBTENIDO A PARTIR DE PLASMA SANGUINEO Y DE FRACCIONES DE PLASMA".

15 Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de trece hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras y una hoja de planos.

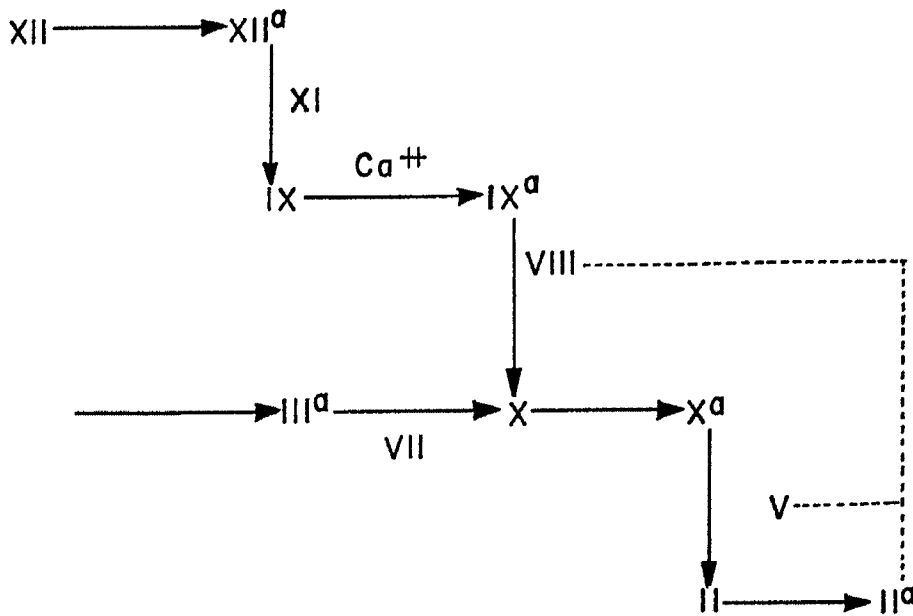
Madrid, 17 de Mayo de 1.973

P.A. de BAXTER LABORATORIES, INC.

Victor Gil Vega

N/

414822



Escala Variable  
Madrid, 17-5-73  
P.A.