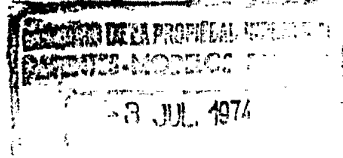




P.- 57.633

BLKX

427365



MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar

PATENTE DE INVENCION
en ESPAÑA
por VEINTE años

A nombre de AKTIEBOLAGET KABI C12K

entidad sueca

establecida en Lindhagensgatan 133, Estocolmo, Suecia

por: "UN METODO DE AISLAMIENTO DE UNO AL MENOS DE LOS
FACTORES DE COAGULACION DE LA SANGRE: FIBRINOGENO,
FACTOR VIII ANTIHEMOFILIA Y FACTOR B".

(Clase Internacional C12k)

21-6-74

- 1 -



-3

Esta invención se refiere al aislamiento de factores de coagulación de la sangre I (fibrinógeno), VIII (factor antihemofilia, abreviadamente FAH), y factor IX (también llamado factor B), con altos rendimientos, partiendo de materiales tisulares animales tales como sangre o productos sanguíneos (por ejemplo plasma) o fracciones de plasma, o se purifica el factor B partiendo de un concentrado de factor B mediante un procedimiento que lleva consigo la etapa esencial de adsorción (como en cromatografía de afinidad) de por lo menos uno de estos factores en un sistema líquido, sobre una matriz de un gel insoluble en agua compuesta principalmente de un hidrato de carbono que forma gel, sulfatado o sulfonado, reticulado, tal como sulfato de dextrano-agarosa reticulado, sulfato de dextrano-dextrano reticulado, heparina-agarosa reticulado y otras tales sustancias que proporcionan matrices de geles, por ejemplo ácido bencidin-2,2-disulfónico-agarosa.

Se ha llevado a cabo a lo largo de los años un trabajo considerable buscando el reconocimiento de los mecanismos de coagulación de la sangre y el aislamiento de los componentes que toman parte. El gran interés en la coagulación de la sangre puede ser explicado en parte por la curiosidad puramente científica en torno



al sistema como tal. Sin embargo, lo primero de todo, el conocimiento de como tiene lugar la coagulación de la sangre y como puede ser influida, es sumamente importante desde el punto de vista clínico. Todavía existen un cierto número de puntos sin aclarar en torno a los mecanismos de coagulación de la sangre, pero hay unanimidad en que la coagulación de la sangre puede ser descrita como un proceso en el que la activación de un componente en cantidad muy pequeña va seguida por la activación sucesiva de un cierto número de componentes, lo que da por resultado eventualmente la formación de un coágulo. Así pues, un efecto inicial relativamente pequeño da por resultado un efecto final apreciable, que depende del efecto multiplicador que existe en el sistema.

Sin embargo, sólo algunos de los diversos componentes que toman parte en el sistema de coagulación de la sangre han sido aislados hasta ahora en estado puro. Estos componentes son denominados habitualmente factores de coagulación y se supone que son doce, designándose cada uno de ellos mediante su respectivo número romano, es decir factor I, factor II, etc., conforme a la nomenclatura establecida por la Comisión Internacional de Hemostasis y Trombosis (Thromb. Diathes, Haemorrhag. Suppl. 13, 1964).



Respecto a los factores de coagulación de la sangre hay razón también para mencionar otros dos sistemas. Uno de ellos es el sistema de inhibidores, que regula la tendencia de la sangre a coagular y evita la formación de trombos. Este sistema contiene entre otros, antitrombina III, inhibidor de factor Xa, inhibidor de factor XIa. El otro es el sistema que se ocupa de la disolución de los posibles trombos, y habitualmente se denomina el sistema fibrinolítico. Contiene plasmina y plasminógeno como componentes importantes.

El factor de coagulación I, es decir el fibrinógeno, es (i) el elemento estructural que forma el gel que resulta de la coagulación de la sangre o plasma, y (ii) una proteína con un peso molecular de 340.000 aproximadamente. Su concentración en el plasma es de 2 mg/ml de plasma aproximadamente. Durante el proceso de coagulación de la sangre se forma una enzima, a saber, la trombina que desdobra hidrolíticamente dos péptidos del fibrinógeno. El desdoblamiento de estos péptidos del fibrinógeno hace que este último altere su estructura y una vez alterado comience a agregarse. Esta agregación da como resultado la formación de un gel, es decir, un coágulo.

El fibrinógeno se usa clínicamente para detener ciertos tipos de hemorragias. Es relativamente



difícil de producir fibrinógeno para uso clínico.

Dado que el fibrinógeno es una molécula relativamente sensible, los métodos de fraccionamiento en su producción han de ser muy suaves. La mayor dificultad
5 consiste en obtener una calidad de fibrinógeno con elevada coagulabilidad y que, a la vez, manifieste una buena estabilidad en solución acuosa.

El factor de coagulación VIII, el factor antihemofilia (denominado brevemente FAH), es una pro-
10 teína con un peso molecular de 1 millón aproximadamente. Se encuentra presente en cantidades muy pequeñas en el plasma sanguíneo, siendo su concentración normal de unos 10 ug/ml de plasma. Uno de los defectos hereditarios de coagulación más conocido se caracteriza por
15 la ausencia del factor VIII (FAH) biológicamente activo. Este defecto es la clásica hemofilia o hemofilia A. La hemofilia grave se manifiesta por sí misma como una tendencia a la hemorragia fuertemente aumentada, en la que la más pequeña herida puede dar lugar a una hemo-
20 rragia mortal.

Esta enfermedad se manifiesta incluso en una edad muy joven, y pueden ocurrir muchos tipos diferentes de complicaciones. Bastante habitualmente los
25 pacientes se ven aquejados de repetidas hemorragias en las articulaciones que conducen a inflamaciones (de las



articulaciones) y a largo plazo a invalidez. Esto hace que la mayor parte de los pacientes graves aquejados de hemofilia se vean fuertemente disminuidos en su motilidad incluso a la edad de 20 años, si no han sido
5 tratados con preparaciones que contienen FAH.

La terapéutica que puede usarse en la hemofilia es la transfusión de sangre (humana) total o plasma e incluso de diversos concentrados que contienen FAH. Las ventajas médicas de usar tales concentrados
10 son evidentes. Los concentrados de FAH disponibles en la actualidad, pueden dividirse en dos tipos diferentes, en parte preparaciones muy concentradas y en parte preparaciones poco concentradas. Las preparaciones usadas principalmente hasta la fecha son del tipo poco concentradas. Son ejemplos de ellas los crioprecipitados según Pool (Pool J., Hershgold, E. K., Pappenhagen, A.,
15 Nature 203 (1964) p. 312), y la fracción I-0 de Cohn (descrita en Blombäck, M. Arkiv Kemi 12 (1958) p. 387).

Ambas preparaciones de FAH poco concentradas contienen cantidades considerables de fibrinógeno. La desventaja existente con este tipo de preparación es que los pacientes necesitan la administración de cantidades relativamente grandes de una solución acuosa de ella, mediante infusión. Recientemente han sido
20 desarrolladas ciertas preparaciones denominadas prepa-
25



raciones muy concentradas de FAH. Con éstas puede administrarse una dosis adecuada de FAH en un volumen de solución acuosa comprendido entre 10 y 15 ml. Este tipo de concentrado de FAH es considerablemente más
5 fácil de usar que el tipo anterior.

Clínicamente las preparaciones muy concentradas parecen actuar bien, pero tienen ciertas desventajas. Desde el punto de vista del aislamiento, existe la desventaja de que el rendimiento de actividad de FAH
10 partiendo del plasma inicial es relativamente bajo. Además, las otras proteínas que se encuentran en las fracciones a partir de las cuales se recupera el FAH no son utilizadas en general. Finalmente, estos métodos necesitan un material de partida de un grado muy elevado,
15 es decir, el plasma sanguíneo debe ser fresco o congelarse inmediatamente después de la recogida de la sangre y su centrifugación subsiguiente.

El factor de coagulación IX, es conocido también como factor B debido a que un tipo de hemofilia,
20 a saber, la hemofilia B, es ocasionada por la deficiencia hereditaria del factor de coagulación IX. La hemofilia B se manifiesta como una tendencia a la hemorragia fuertemente aumentada en los traumas y en las intervenciones quirúrgicas. En casos graves, pueden presentarse
25 hematomas subcutáneos e intramusculares grandes.



Las hemorragias en las articulaciones con deformaciones secundarias de las articulaciones, que dan como resultado invalidez, es un estado bastante común en relación con la hemofilia B. El tratamiento que puede
5 darse es cualquiera de diversas formas de terapéutica sustitucional, a saber, transfusión de sangre, plasma o algunos de los concentrados de factor IX disponibles en la actualidad.

El tratamiento puede ser o bien profiláctico y efectuarse durante un período de tiempo largo,
10 entre otras circunstancias, con objeto de evitar la génesis de la lesiones en las articulaciones antes citadas, o bien puede darse en relación con operaciones, extracción de dientes, y otras situaciones en que es
15 grande el riesgo de hemorragia. Los métodos de tratamiento de que se dispone en la actualidad, tienen muchas desventajas. La transfusión de sangre y plasma lleva consigo el riesgo de transmisión de hepatitis y en alguna extensión de provocar inmunización. Con los
20 concentrados de factor IX de que se dispone en la actualidad, existe un riesgo evidente de transmisión de hepatitis.

La presente invención hace posible eliminar las desventajas antes mencionadas. Los diversos procedimientos, comprendidos por la invención, para aislar
25



los factores de coagulación I, VIII y IX tienen en común que incluyen la nueva etapa esencial de adsorber uno o más de ellos, partiendo de un sistema líquido acuoso en un medio de adsorción que es un hidrato de carbono que forma una matriz de gel reticulado, que contiene grupos sulfatados o sulfonados. Así pues, aquellos son adsorbidos en el gel y purificados de este modo. En la purificación o aislamiento del factor de coagulación VIII, la matriz del gel sulfatado se usa para adsorber la fracción predominante, es decir, el fibrinógeno, del material de partida.

Operaciones llevadas a cabo usando plasma sanguíneo como material de partida, han mostrado que bajo condiciones adecuadas podía inducirse al factor I y al factor IX a unirse casi cuantitativamente al gel de agarosa que contiene heparina, es decir, cada uno de estos factores por separado.

Cada uno de estos factores I y IX, respectivamente, se eluye después poniendo en contacto el gel que aloja el adsorbato con una solución amortiguadora que difiere en composición de aquella en que se disolvió el material proteínico. Tienen lugar variaciones en la pureza de las fracciones proteínicas de partida. Sin embargo, se obtuvieron resultados considerablemente mejores al usar como material de partida la pasta de frac-



ción I de Cohn (Journal of the American Chemical Society, 1946, volumen 48 página 459) y también al usar un concentrado de factor B.

5 Es una característica de la invención el que tanto el factor de coagulación I como el factor VIII, pueden aislarse, por así decir, sucesivamente partiendo del mismo material inicial, tal como la frac-
10 ción I-0 de Cohn o un crioprecipitado (Pool y otros, como se ha citado anteriormente). Por ejemplo, opera- ciones llevadas a cabo sobre esta fase de la invención usando sulfato de dextrano-agarosa (la agarosa especí- ficamente es SEPHAROSE 4B, un gel de agarosa globular preparado dejando gelificar una solución acuosa al 4%
15 de agarosa, en forma de glóbulos, un producto de la firma Pharmacia Fine Chemicals de Piscataway, N.J. Es- tados Unidos, y de Upsala, Suecia), mostraron que era posible adsorber la parte principal del fibrinógeno en el gel y dejar casi cuantitativamente la actividad del FAH en la solución (sin adsorber).

20 Después de ello se separa el gel, y el FAH que queda en la solución se precipita mediante proce- dimientos conocidos (por ejemplo, según se ha visto anteriormente, en la pag 4 líneas 13 y 14, en Pool, Hershgold y Pappenhagen). Seguidamente puede obtenerse
25 una solución muy concentrada de FAH disolviendo este



precipitado en una pequeña cantidad de una solución amortiguadora de un disolvente proteínico. El fibrinógeno puede ser eluido entonces del gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE mediante una solución amortiguadora de concentración iónica creciente (por ejemplo, añadiendo cloruro sódico a la composición de la solución sin adsorber). Este fibrinógeno puede ser precipitado más tarde y separado, y prepararse una solución muy concentrada a partir de él.

10 Esta clase de procedimiento tiene muchas ventajas en comparación con los procedimientos usados con anterioridad para obtener preparaciones de FAH muy concentradas, por ejemplo, y por encima de todo, el rendimiento de FAH es significativamente más elevado.

15 Una ventaja adicional es que además del elevado rendimiento de FAH el fibrinógeno eluido de la matriz de gel en el mismo procedimiento de aislamiento global, puede ser usado también. Otra ventaja apreciable es que en este nuevo procedimiento puede usarse como fuente de material de partida para el FAH así como también para el fibrinógeno, incluso sangre o plasma sanguíneo antiguos.

20 En las preparaciones de factor IX se usó como material de partida un concentrado de factor IX
25 preparado por adsorción de factor IX juntamente con

-3 JUL 68


5 varias otras proteínas, en DEAE-SEPHADEX (un dietilamino-etil-dextrano reticulado con epíclorhidrina, en forma globular, producto de Pharmacia Fine Chemicals, de Piscataway, N.J., Estados Unidos, y de Upsala, Suecia) a partir del centrifugado de la fracción de Cohn I (método 6). La preparación de este concentrado se describe con mayor detalle por Tullis y colaboradores (New England Journal of Medicine, volumen 273, página 667, 1965). El factor de coagulación IX se adsorbió
10 partiendo de tal concentrado, en gel de heparina-SEPHAROSE 4B u otros geles de actuación semejante (como se pone brevemente de ejemplo en esta Memoria más adelante), y se eluyó del gel cambiando la solución amortiguadora de disolvente proteínico, por ejemplo, aumentando su fuerza iónica desde 0,06 M aproximadamente
15 hasta 2M aproximadamente en cloruro de sodio. El factor IX obtenido de este modo mostró indicios de un componente adicional, como pudo apreciarse mediante inmunoelectroforesis. Sin embargo, el fraccionamiento posterior mediante filtración por gel de SEPHADEX G-150 (un dextrano reticulado con epíclorhidrina, en forma globular, para cromatografía de filtración por gel, que tiene un valor de recuperación de agua de 15 ml/g, es decir miligramos por gramo de glóbulos secos y que es un
20 producto de la firma Pharmacia Fine Chemicals antes cita-
25

-3 JUL 1974

da), proporcionó un producto puro desde el punto de vista inmunológico.

No obstante se apreció una cierta heterogeneidad en cuanto al peso molecular. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que ésto era debido al hecho de que la preparación contenía tanto factor IX activado como en forma no activada. El factor IX no activado tenía un peso molecular de 80.000 aproximadamente y el factor activado tenía un peso molecular de 50.000 aproximadamente. Por adición a la solución amortiguadora usada para disolver el material proteínico de partida, de p-amino benzamida 0,002 M (un inhibidor de proteasa) antes de mezclar la solución con el gel adsorbente, se obtuvo una preparación de factor IX totalmente desprovista de factor IX activado y que contenía solamente factor IX puro en forma no activada.

Son ilustrativas de las matrices de geles insolubles en agua efectivas en el procedimiento de la invención, aquellas que tienen grupos sulfato unidos a un polisacárido que forma gel unido a otra parte de polisacárido, tal como el sulfato de dextrano-agarosa reticulado, dextrano-sulfato de dextrano reticulado, heparina-agarosa reticulado, sulfato de condroitina-agarosa reticulado, sulfato de dextrano epiclorhidrina-agarosa reticulado, y los compuestos principalmente



de ácido bencidindisulfónico unido a un resto de polisacárido, tal como ácido bencidin-2,2-disulfónico-agarosa y ácido bencidin-2,2-disulfónico-dextrano. El método más común de preparar estas matrices de geles lleva consigo proporcionar la reticulación usando bromuro de cianógeno, en condiciones de pH alcalino.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero no están destinados a restringirla.

10 Ejemplo 1 - FAH y fibrinógeno aislados de la fracción I-O de Cohn, adsorbiendo el fibrinógeno sobre gel de sulfato de dextrano-agarosa reticulado:

Preparación de gel de sulfato de dextrano-agarosa reticulado usando agarosa "SEPHAROSE 4B":

15 Se disolvió bromuro de cianógeno (35 g) en 500 ml de agua, seguido de la adición de 30 g de sulfato de dextrano. Se añadieron a ello unos 1000 ml de gel de SEPHAROSE 4B y 300 ml de agua, y se mezcló todo. Se dejó la mezcla bajo agitación y se mantuvo constantemente su pH en 11 durante 7 minutos, mediante la adición de solución de hidróxido alcalino. Después de esto se interrumpió la adición de la solución alcalina y se dejó descender lentamente el pH por sí mismo. Se continuó la agitación durante 48 horas a temperatura ambiente y se continuó lavando el gel. El gel de sul-

20

25



fato de dextrano-SEPHAROSE 4B reticulado estaba entonces listo para su uso.

Experimento de fraccionamiento de fibrinógeno y FAH
partiendo de fracción I-0 de Cohn:

5 10 g de fracción I-0 de Cohn liofilizada, procedente de plasma fresco congelado, que contenían aproximadamente 1.500 unidades de FAH, en 1.500 ml de solución amortiguadora de citrato 0,02 M (pH 6,8), Se añadió a la solución gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE 4B fil-
10 trado, seco, (1000 ml), y la mezcla se agitó durante 30 minutos. El gel se separó después y se lavó con 200 ml de solución amortiguadora de citrato. Se mezclaron la solución no adsorbida y el líquido de lavado. El análisis mostró que esta solución mezclada contenía el 6 por
15 ciento de la cantidad de proteína primitiva y el 65 por ciento del material activo de FAH de la fracción I-0 de Cohn de partida. El FAH fue precipitado mediante adición a esta solución mixta de citrato sódico a pH 7,1. La disolución de 0,4 g de este precipitado de FAH en unos 35
20 ml de solución amortiguadora de fosfato-NaCl-glicocola (pH 6,9) proporcionó una solución con una actividad específica de 21 unidades de FAH/ml. El rendimiento total de FAH procedente de la fracción I-0 de Cohn fue 55 por ciento. La desorción del fibrinógeno unido al gel se
25 efectuó mediante elución con NaCl 2M. La mayor parte del



contenido de fibrinógeno de la fracción de Cohn de
partida fue recuperada.

Los análisis de FAH se llevaron a cabo se-
gún J.J.Veltkampf y otros, Thromb. Diath. Haemorrhag.
5 19-20 (1968) pag. 279. La concentración proteínica fue
determinada midiendo la absorción en el UV a 280 nm.

Ejemplo 2 - FAH y fibrinógeno partiendo de pasta de
fracción I de Cohn procedente de plasma antiguo, por
10 adsorción del fibrinógeno sobre gel de sulfato de dex-
trano-ECD-SEPHAROSE ("ECD-SEPHAROSE" significa glóbulos
de agarosa tratada con epíclorhidrina).

Se mezcló 1 litro aproximadamente de SEPHA-
ROSE 4B con 1 litro de hidróxido de sodio 1 M y 20 ml
15 de epíclorhidrina y 5 g de borohidruro de sodio (NaBH_4).
La mezcla se mantuvo a 60°C, bajo agitación, durante 1
hora. El gel se lavó después con agua caliente y se mez-
cló con 500 ml de solución 2 M de hidróxido de sodio que
contenían 2,5 g de borohidruro de sodio. La mezcla se
20 calentó en autoclave a 120°C durante 1 hora. El gel se
lavó entonces con 500 ml de solución de hidróxido de
sodio 0,2 M que contenían 2,5 g de borohidruro de sodio.
Se añadió lentamente ácido acético glacial hasta que el
pH de la mezcla hubo descendido a 4 aproximadamente. El
25 gel se lavó con agua y se unió a sulfato de dextrano



mediante el uso del bromuro de cianógeno, del mismo modo descrito en el Ejemplo 1.

Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH procedentes de pasta de fracción I de Cohn:

5 de pasta de fracción I de Cohn (procedente de plasma antiguo) en solución amortiguadora de citrato sódico 0,02M (pH 6,8) se añadió un litro de este gel de sulfato de dextrano-ECD-SEPHAROSE reticulado preparado anteriormente. Se dejó estar la mezcla con agitación durante 15 minutos, seguido de decantación del gel (con su adsorbato unido) sobre un filtro. La solución amortiguada inicial que, antes de la etapa de adsorción contenía aproximadamente 10 mg de proteína/ml, de solución y 0,5 unidades de FAH/ml, produjo entonces, después de 15 la adsorción, una solución de efluente no adsorbido que contenía 1,4 mg de proteína/ml y 0,36 unidades de FAH/ml. De esta solución de efluente se precipitó el material de FAH activo mediante adición de citrato sódico a pH 7,1. La disolución de 1 g del precipitado separado (justamente antes) en unos 20 ml de la solución amortiguadora de glicocola-NaCl-fosfato proporcionó una solución con una actividad específica de 16 unidades de FAH/ml. El rendimiento total de FAH fue de 62 por ciento.

25 La desorción del fibrinógeno unido al gel se hizo mediante elución con solución 2 M de cloruro de



sodio. Se recuperó más del 90% del fibrinógeno.

5 Ejemplo 3 - FAH y fibrinógeno de crioprecipitado, adsorbiendo inicialmente el fibrinógeno sobre gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE reticulado:

10 Se preparó gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE 4B como en el Ejemplo 1. A 1 litro de una solución de 10 g de crioprecipitado en solución amortiguadora de citrato sódico 0,02 M (pH 6,8) se añadió un litro de este gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE. La mezcla se agitó durante 15 minutos, seguido de decantación del gel sobre un filtro y recogida de la solución no adsorbida. La solución primitiva contenía aproximadamente 14 mg de proteína/ml de la solución no adsorbida y 0,97 unidades de FAH/litro de solución. El material activo de FAH se precipitó después mediante citrato sódico como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. La desorción del fibrinógeno del gel se efectuó con NaCl 2M como en los Ejemplos 1 ó 2. El rendimiento de FAH fue de 65 por ciento y el rendimiento de fibrinógeno fue de 82 por ciento.

25 Ejemplo 4 - FAH y fibrinógeno partiendo de fracción I-0 de Cohn mediante adsorción inicial de fibrinógeno sobre gel de sulfato de dextrano-dextrano reticulado.



Se disolvieron 15 g de dextrano "500"
 (peso molecular promedio 500.000) en 200 ml de agua.
 Se disolvieron 10 g de bromuro de cianógeno en 100 ml
 de agua, después de lo cual se añadieron 5 g de sul-
 5 fato de dextrano "500". Las soluciones se mezclaron,
 se ajustó el pH a 11 por adición de hidróxido de sodio
 y se mantuvo en este valor durante 7 minutos, con agi-
 tación simultánea de la mezcla. El gel resultante for-
 mado se dejó estar 24 horas bajo agitación y después
 10 se lavó con solución amortiguadora de bicarbonato só-
 dico 0,1 M y luego con agua.

Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH partiendo de frac-
ción I-0 de Cohn: Se llevaron a cabo las característi-
 cas generales de fraccionamiento como se describieron
 15 en el Ejemplo 1 sobre fracción I-0 de Cohn procedente
 de plasma nuevo congelado, utilizado como materia de
 partida. Esto dió por resultado la adsorción del gel
 anteriormente obtenida, del 62 por ciento del material
 proteínico. El rendimiento de FAH fue 90 por ciento.
 20 El fibrinógeno se eluyó cuantitativamente con NaCl 2M.

Ejemplo 5 - FAH y fibrinógeno partiendo de fracción
I-0 de Cohn mediante adsorción inicial del fibrinógeno
en gel de Heparina-SEPHAROSE reticulado: Preparación
 25 de gel de Heparina-SEPHAROSE 4B: Se disolvieron 5 g de



bromuro de cianógeno en 100 ml de agua, después de lo cual se añadió 1,5 g de heparina a la solución y la mezcla se dejó estar con agitación mientras se mantenía el pH constante en 11 durante 7 minutos, mediante
5 adición de hidróxido de sodio. Después de esto se interrumpió la adición de la solución alcalina y se dejó que el pH descendiera lentamente. Se continuó la agitación durante 48 horas a temperatura ambiente, después de los cual se lavó el gel de modo semejante al
10 del Ejemplo 4.

Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH partiendo de fracción I-0 de Cohn: A 30 ml de una solución de fracción I-0 de Cohn liofilizada procedente de plasma nuevo congelado, en citrato sódico 0,02M (pH 6,8), se
15 añadieron 10 g del gel de heparina-SEPHAROSE anterior decantado.

Se dejó la mezcla en agitación durante 15 minutos, después de lo cual el gel (que contenía el adsorbato) se decantó sobre un filtro. El 63 por ciento de la actividad primitiva de FAH quedó en la solución no adsorbida así como también el 4 por ciento de la cantidad de fibrinógeno que se encontraba presente desde el comienzo. El material activo de FAH se precipitó después mediante citrato sódico a un pH de 7,1
20 como en el Ejemplo 1. El fribinógeno se eluyó del gel
25



con NaCl 2M. El rendimiento de fibrinógeno fue de 85 por ciento.

Ejemplo 6 - FAH y fibrinógeno partiendo de fracción

5 I-0 de Cohn mediante adsorción del fibrinógeno en gel de sulfato de condroitina-SEPHAROSE:

Preparación del gel de sulfato de condroitina-SEPHAROSE reticulado: Se añadió 1 g de bromuro de cianógeno a una solución acuosa que contenía 250 mg de sulfato de condroitina C, después de lo cual se añadieron 40 ml de gel de SEPHAROSE 4B. La mezcla se dejó estar a pH 11 bajo agitación durante 7 minutos, después de lo cual se dejó descender el pH, y se permitió que el gel resultante se mantuviese en agitación durante 48 horas. El gel se lavó entonces y quedó listo para el uso.

15 Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH partiendo de fracción I-0 de Cohn

Se disolvieron en 20 ml de solución amortiguadora de citrato (pH 6,8) unos 0,2 g de fracción I-0 de Cohn liofilizada procedente de plasma nuevo congelado. Después se añadió sobre 20 ml del gel obtenido anteriormente y se dejó la mezcla en agitación durante 15 minutos, después de lo cual el gel (con su adsorbato) se separó por filtración. El análisis de la solución del filtrado no absorbido mostró que el



44 por ciento del fibrinógeno había sido adsorbido sobre el gel. El rendimiento de FAH fue de 80 por ciento. El fibrinógeno se desorbió del gel con NaCl 2M como en cualquiera de los Ejemplos 1, 2, 4 ó 5.

5

Ejemplo 7 - FAH y fibrinógeno partiendo de fracción I-0 de Cohn mediante adsorción inicial del fibrinógeno en gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE preparado mediante reticulación inducida por epíclorhidrina:

10

Preparación de gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE conforme al procedimiento de la ECD: Se mezcló 1 litro de gel de SEPHAROSE 4B con 500 ml de una solución acuosa que contenía 30 g de sulfato de dextrano. A esta mezcla se añadieron 1 litro de solución 1 M de hidróxido de sodio, 40 ml de epíclorhidrina y 10 g de borohidruro de sodio. La mezcla se mantuvo a 60°C bajo agitación durante 1 hora. El gel resultante se lavó con agua caliente y se mezcló con 500 ml de solución de hidróxido de sodio 2 M y 5 g de borohidruro de sodio.

15

20

La mezcla se calentó en autoclave durante 1 hora a 120°C, después de lo cual se lavó el gel con una solución del álcalí que contenía borohidruro de sodio. Después se añadió lentamente ácido acético glacial hasta pH 4. El gel se lavó con agua y entonces estuvo listo para su uso.

25



Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH partiendo de fracción I-0 de Cohn:

5 Se dispersó en la solución amortiguadora de citrato fracción I-0 de Cohn liofilizada procedente de plasma nuevo congelado, y se mezcló con el gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE 4B reticulado, como en el Ejemplo 1, y el gel con su adsorbato y la solución mixta no adsorbida y el lavado del gel fueron tratados como se indica en el Ejemplo 1. La solución no adsorbida
10 obtenida después de la adsorción del fibrinógeno sobre el gel, poseía 5 por ciento del contenido de proteína primitivo y 57 por ciento de su actividad de FAH. El material activo de FAH se precipitó entonces con citrato sódico, por ejemplo, como en el Ejemplo 2. Se eluyó el fibrinógeno del gel con NaCl 2 M y su rendimiento
15 fué de 90 por ciento.

Ejemplo 8 - FAH y fibrinógeno partiendo de fracción I-0 de Cohn mediante adsorción del fibrinógeno en gel de ácido bencidindisulfónico sustituido-SEPHAROSE:

20 Preparación de gel de ácido bencidindisulfónico sustituido-SEPHAROSE: Se mezclaron 250 ml de gel de SEPHAROSE 4B en 100 ml de agua y se añadieron 10 g de bromuro de cianógeno disueltos en 100 ml de agua. Mediante adición de una solución de hidróxido de sodio, el pH se
25



-3 JUL. 1974

5 aumentó a 11,0 y se mantuvo en este nivel bajo agitación, durante 7 minutos, después de lo cual el gel tratado se decantó sobre un filtro de vidrio y se lavó con agua fría. Se disolvieron 14 g de ácido bencidin-2,2-disulfónico en 60 ml de agua, con adición simultánea de hidróxido alcalino para mantener el pH en 7. La solución de ácido bencidina disulfónico se añadió al gel y la mezcla se dejó en agitación a 5°C durante la noche, seguido de lavado del gel con soluciones amortiguadoras.

10 Fraccionamiento de fibrinógeno y FAH partiendo de fracción I-0 de Cohn:

15 Se disolvió aproximadamente 1/2 g de fracción I-0 de Cohn liofilizada procedente de plasma nuevo congelado, en 40 ml de agua, y se añadieron 10 ml de gel seco succionado, después de lo cual la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se filtró el gel y el fibrinógeno se eluyó del gel con solución 2M de NaCl, como en cualquiera de los Ejemplos anteriores. Usando citrato sódico se precipitó el material activo de FAH y se separó del modo descrito en los Ejemplos anteriores. El 85 por ciento del fibrinógeno primitivo había sido adsorbido en la matriz, y el rendimiento de FAH fue 80 por ciento.

25 Ejemplo 9 - Factor IX obtenido por adsorción de plasma en gel de heparina-SEPHAROSE:

Se preparó un gel de heparina-SEPHAROSE mezclando 100 ml de una solución de heparina (5.000 unidades/ml) en agua, con 200 ml de gel de SEPHAROSE 4B, seguido de adición de 4 g de bromuro de cianógeno. El pH se ajustó a 11 y se mantuvo así durante 7 minutos, después de lo cual se dejó que el pH descendiera. Se dejó estar el gel durante la noche con agitación, se lavó al día siguiente y estuvo listo para el uso.

A una columna (200 ml de volumen) rellena con el gel de heparina-SEPHAROSE reticulado y equilibrada con solución amortiguadora de tris(hidroximetil)aminometano 0,02M, citrato 0,01 M, NaCl 0,15M (para un pH de 8,4), se cargaron 40 ml de plasma sanguíneo humano. Al eluir este gel reticulado con esta misma solución amortiguadora, la mayor parte no adsorbida del plasma se lavó a través de la columna. La porción adsorbida de la columna se eluyó después mediante elución de gradiente con solución amortiguadora de citrato 0,05 M (para un pH 5,0) aumentando continuamente su fuerza iónica mediante adición de NaCl 2M. La diálisis de este eluato frente a agua destilada y liofilización posterior del dializado obtenido como residuo, proporcionó una fracción con actividad de factor IX, cuya actividad específica era 60 veces la del plasma de partida, calculada por mg de proteína. El rendimiento fue de 35 por ciento.



La determinación de la actividad del factor IX se efectuó mediante análisis de coagulación según el método de J.J. Veltkampf y otros, (Thromb. Diath. Haemorrhag., 19-20 (1968) p. 279).

5

Ejemplo 10 - Factor IX obtenido partiendo de un concentrado de factor B mediante adsorción en un gel de heparina-SEPHAROSE:

10 El concentrado de factor B (que tenía 8 unidades de factor IX/ml) usado como material de partida, se preparó adsorbiendo el líquido que sobrenadaba procedente de la fracción I de Cohn (método 6) (Jour. Am. Chem. Soc., anterior p.6 líneas 18-19) en gel de DEAE-
15 -SEPHADEX y elución subsiguiente de tal gel con una solución amortiguadora disolvente de proteínas usada habitualmente, de modo conocido.

20 Se disolvió aproximadamente 0,5 g de proteína (como este concentrado de factor B) que contenía aproximadamente 400 unidades de factor IX, en 35 ml de solución amortiguadora de citrato sódico 0,03 M, NaCl 0,06 M (pH 7,6). La solución se depositó sobre una columna (210 ml de volumen) de gel de heparina-SEPHAROSE 4B preparado según se ha descrito en el Ejemplo 5, que
25 había sido equilibrado con esta solución amortiguadora de citrato-NaCl. Por elución de este gel reticulado con

esta misma solución amortiguadora, la mayor parte del
concentrado de partida no adsorbido se lavó ininterrum-
pidamente a través de la columna. La desorción del fac-
tor IX adsorbido se consiguió mediante elución de gra-
5 diente de esta columna de gel, con solución amortigua-
dora de ácido acético 0,1 M, acetato sódico (pH 5,0),
aumentando continuamente su fuerza iónica mediante adi-
ción de la solución amortiguadora correspondiente que
contenía NaCl 2 M. La liofilización de este eluato pro-
10 porcionó una fracción proteínica con una fuerte activi-
dad de factor IX.

El cálculo de la producción de actividad
mostró que se había recuperado el 86 por ciento de la
actividad. Por inmunoelectroforesis se puso de manifies-
15 to que este producto contenía indicios de otro componen-
te. Otra operación de filtración por gel sobre SEPHADEX
G-150 proporcionó actividad apreciada en dos zonas, en
parte en el volumen de elución que correspondía a un pe-
so molecular de 80.000 aproximadamente y en parte en el
20 volumen de elución que correspondía a un peso molecular
de 50.000. La sustancia de peso molecular más bajo mues-
tra ser factor IX activado. El grado de pureza del ma-
terial de peso molecular más alto comparado con el del
concentrado de partida muestra aproximadamente una puri-
25 ficación de 40 veces.



Ejemplo 11 - Factor IX partiendo de concentrado de factor B mediante adsorción en gel de heparina-SEPHAROSE reticulado, en presencia de un inhibidor de proteasa:

Aproximadamente 0,5 g de concentrado de factor B (como
5 en el Ejemplo 10) que contenía unas 400 unidades de factor IX, se disolvió en 35 ml de solución amortiguadora de citrato 0,03 M, NaCl 0,06 M, p-aminobenzamidina 0,002 M (pH 7,6) (la p-aminobenzamidina es un inhibidor de proteasas que inhibe entre otras, la tripsina y la trombina).
10 La solución se introdujo en una columna que contenía gel de heparina-SEPHAROSE 4B reticulado, y después se eluyó y desorbió según se ha descrito en el Ejemplo 10.

Se obtuvo una fracción con elevada actividad de factor IX después de elución con solución amortiguadora de tris(hidroximetil)aminometano 0,01 M. Por separación posterior sobre gel de SEPHADEX G-150 se obtuvo una proteína homogénea activa con un peso molecular de 82.000.
15 El rendimiento total de actividad de factor IX fue de 370 unidades (92,5 por ciento), una purificación de 52 veces.

20

Ejemplo 12 - Factor IX activado partiendo de fracción III de Cohn (método 6) mediante adsorción en gel de heparina-SEPHAROSE reticulado:

Aproximadamente 10 kg de pasta de fracción
25 III de Cohn (método 6) (Jour. Am. Chem. Soc., anterior,



-3-

pag. 6, líneas 18-19), se disolvieron en 40 litros de solución amortiguadora de fosfatos disódico y monosódico 0,01 M, NaCl 0,15 M (pH 7). El material sin disolver se centrifugó. Se añadieron a la solución 18 litros
5 de gel de DEAE-SEPHADEX. La mezcla se dejó en agitación durante 1 hora, después de lo cual el gel de DEAE-SEPHADEX se separó (decantó) y se lavó con la solución amortiguadora anterior. Se rellenoó una columna con el gel, y después de esto se desorbió con solución amortiguadora
10 de fosfatos 0,05 M, NaCl 1 M (pH 7). Se obtuvo una fracción proteínica (eluato) de 180 g con actividad de factor IX. Esta solución de eluato, después de diálisis (contra agua destilada) y cambio de solución amortiguadora a citrato 0,03 M, NaCl 0,06 M (pH 7,6), se adsorbió
15 en 6 litros de gel de heparina-SEPHAROSE 4B reticulado. Este gel que contenía adsorbato, se cargó a una columna y después se eluyó como en el Ejemplo 9. Esto proporcionó una fracción con actividad de factor IX. Estudios por filtración por gel mostraron que este material era principalmente
20 factor IX activado, es decir, el componente con el peso molecular de 50.000 aproximadamente.

Ejemplo 13 - Factor IX partiendo de concentrado de factor B mediante adsorción en gel de heparina reticulado:

25 Se preparó gel de heparina reticulado aña-



diendo 6 g de bromuro de cianógeno a 100 ml de una solución de heparina (5000 unidades/ml). El pH se ajustó a 11 y se mantuvo en este nivel durante 8 minutos, después de lo cual se dejó que el pH descendiera por sí mismo.

5 Se formó un gel que se dejó en reposo durante un par de horas y después se lavó con solución amortiguadora de bicarbonato y luego con agua, después de lo cual el gel de heparina reticulado estaba listo para su uso.

10 Se rellenó una columna con este gel y se depositó sobre ella una solución (amortiguadora) de concentrado de factor B (como en el Ejemplo 10). La adsorción y elución se llevaron a cabo como en el Ejemplo 9, y se obtuvo una fracción de factor IX con un grado relativamente elevado de purificación (27 veces, comparado con el del concentrado de factor B inicial). Rendimiento 62
15 por ciento.

Ejemplo 14 - Factor IX partiendo de concentrado de factor B mediante adsorción en gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE reticulado:

20 Se preparó un gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE reticulado, añadiendo 100 ml de gel de SEPHAROSE 4B a 50 ml de sulfato de dextrano después de lo cual se añadieron 2 g de bromuro de cianógeno. El pH se ajustó a
25 11 y se mantuvo en este valor durante 7 minutos. A conti-



nuación se dejó descender por sí mismo. El gel de sulfato de dextrano reticulado se dejó en reposo durante la noche y después se lavó. Este gel reticulado se colocó en una columna y se depositó sobre ella una solución de concentrado de factor B (como en el Ejemplo 10),
5 La desorción y elución se llevaron a cabo como en el Ejemplo 9. La purificación obtenida fue de 12 veces aproximadamente la del material de partida y el rendimiento fue de 17 por ciento.

10

Ejemplo 15 - Factor IX partiendo de concentrado de factor B mediante adsorción en gel de sulfato de condroitina-SEPHAROSE reticulado:

Se obtuvo un gel de sulfato de condroitina
15 C-SEPHAROSE reticulado usando sulfato de condroitina C en un procedimiento correspondiente al usado para el gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE reticulado del Ejemplo 6.

El gel reticulado resultante se colocó en una columna y se depositó sobre ella una solución de concentrado de factor B (como en el Ejemplo 10). La elución y desorción se efectuaron como en el Ejemplo 9. El grado de purificación obtenido fue de unas 30 veces el del material de partida y el rendimiento fue de 37 por ciento.

25 Ejemplo 16 - Purificación de factor I, VIII y IX partien-



do del mismo material inicial:

Se preparó un gel de sulfato de dextrano-
-SEPHAROSE conforme al Ejemplo 1, con excepción de que
la escala se aumentó a 10 litros de gel. Se preparó un
5 gel de heparina-SEPHAROSE según el Ejemplo 9 pero la
escala se aumentó para proporcionar un litro de gel.

Se descongelaron 30 kilos de plasma conge-
lado, seguido de precipitación de fracción I de Cohn
(método 6) mediante etanol al 8 por ciento y centrifu-
10 gación en una centrífuga de Sharples. Se recogió el lí-
quido que sobrenadaba y se usó para la preparación de
factor IX como se describe más adelante en este Ejemplo.
El precipitado de fracción I se fragmentó y se disolvió
en 9,6 litros de solución amortiguadora de citrato 0,02M
15 de pH 6,8. A la solución se añadieron 180 ml de gel de
Al(OH)₃ de 2 por ciento y la mezcla se agitó durante 30
minutos; el gel se separó por centrifugación. A la solu-
ción se añadieron después 10 litros de gel de sulfato
de dextrano-SEPHAROSE y la mezcla se agitó durante 30
20 minutos. El gel se separó sobre un filtro y el material
activo de FAH presente en la solución se precipitó por
adición de citrato sódico según se ha descrito más ade-
lante. El material precipitado contenía 0,7 unidades de
FAH/ mg de proteína y pudo ser disuelto proporcionando
25 una solución que contenía 30 unidades de FAH/ml. El ren-



dimiento calculado a partir del contenido de FAH del plasma fue de 34 por ciento. El fibrinógeno (factor I) pudo ser obtenido por elución del gel de sulfato de dextrano-SEPHAROSE con NaCl 2M.

5 El fibrinógeno obtenido tenía una pureza de 89 por ciento y el rendimiento fue de 84 por ciento.

Se preparó factor IX a partir de la capa que sobrenada después de precipitación de la fracción I de Cohn. A esta solución (32 litros) se añadieron
10 5 litros de gel de DEAE-SEPHADEX hinchado. La mezcla se agitó durante una hora, seguido de separación del gel por decantación. Después de lavar el gel de DEAE-SEPHADEX se eluyó con solución amortiguadora de fosfato 0,05M, NaCl 1 M, pH 7,0. La fracción proteínica obtenida se dializó frente a citrato 0,03M, NaCl 0,06M,
15 pH 7,6. A la solución se añadió después un litro de gel de heparina-SEPHAROSE bajo agitación. El gel se colocó como relleno en una columna y se desorbió conforme al Ejemplo 9. Se obtuvo una fracción con actividad de factor IX que después de diálisis y liofilización se sometió a filtración por gel sobre SEPHADEX G200. Se obtuvo una preparación de factor IX que contenía 52 unidades/mg de proteína. El rendimiento total a partir del plasma fue de 47 por ciento.

25 Los Ejemplos 9 a 15 muestran el aislamiento



-3

del único factor de coagulación de la sangre, es decir, IX, a partir de sus materiales de partida respectivamente separados. Los Ejemplos 1 a 8 ilustran el aislamiento respectivo separado de los dos factores de coagulación de la sangre, fibrinógeno y FAH, de un solo material de partida. El Ejemplo 16 pone de ejemplo el aislamiento separado de cada uno de los tres factores de coagulación de la sangre a partir de un solo material inicial.

10 Los diversos ejemplos muestran el uso de sus respectivas fuentes específicas de material de partida para cualesquiera, uno, dos o tres de los factores de coagulación de la sangre I, VIII y IX. No obstante, puede usarse cualquier producto tisular sanguíneo animal que contenga cualquiera de estos factores de coagulación de la sangre. Tal producto tisular sanguíneo puede ser de cualquier animal con sangre, tanto si es humano como bovino, u otro mamífero u otro animal que contenga cualquiera de estos factores de coagulación.

20 La expresión "producto tisular sanguíneo animal" comprende principalmente suero sanguíneo, plasma sanguíneo (tanto si es fresco como si es antiguo), así como también cualquiera de las fracciones o concentrados que contienen factores de coagulación procedentes de seres humanos o bovinos o sangre de otros animales,



5 suero sanguíneo o plasma sanguíneo, tal como el crio-
precipitado, así como los diferentes tipos de concen-
trados de FAH disponibles con anterioridad, como las
preparaciones denominadas parcialmente poco concentra-
das y las parcialmente muy concentradas, o las denomi-
nadas preparaciones de FAH concentradas, o el concen-
trado de factor B.

10 El sulfato de dextrano usado en varios de
los ejemplos es, como proporciona su suministrador (la
firma Pharmacia Fine Chemicals antes citada), sulfato
de dextrano sódico en realidad. Comunmente se hace re-
ferencia al mismo simplemente como sulfato de dextrano,
no sólo por los suministradores y en su bibliografía,
15 sino en otras bibliografías. Se suministra en forma de
sal sódica debido a su mayor estabilidad a lo largo del
tiempo en tal forma. Puede ser usado en cualquiera de
ambas formas en la invención, de modo que la expresión
"sulfato de dextrano" se usa en esta Memoria para la for-
ma de sal sódica también.

20 El SEPHAROSE 4B no se suministra en forma
de góbulos secos. Así pues, en aquellos ejemplos que
mencionan que se toma un cierto volumen de este agente
de adsorción, se usó en lugar de en la forma en que es
suministrado, en una forma viscosa, capaz de fluir, pe-
25 ro no en una forma capaz de fluir francamente líquida.



En la expresión "sulfato de dextranoepi-
clorhidrina-agarosa reticulado" la parte "epiclorhi-
drina agarosa" significa que la agarosa, independientemente,
se hizo reaccionar por separado con epiclorhidrina. Así pués, "reticulado" en la mayor parte de estas dos expresiones citadas, se refiere, como muestra el Ejemplo 2, a que también hubo una reticulación mediante una reacción de reticulación separada entre el sulfato de dextrano y la agarosa tratada con epiclorhidrina.

Además, el Ejemplo 7 muestra que puede usarse epiclorhidrina como agente de reticulación en el medio de reacción que contiene sulfato de dextrano y agarosa (por ejemplo SEPHAROSE 4B) para proporcionar la reticulación entre las dos sustancias polisacárido usadas en la preparación de las matrices de gel insolubles en agua, reticuladas, para el proceso de la invención. Así pués, a tal matriz de gel se denomina en el Ejemplo II gel de sulfato de dextrano agarosa reticulado con ECD.

El agarosa-ácido bencidin-2,2-disulfónico reticulado del Ejemplo 8 puede ser reemplazado en su procedimiento por la cantidad correspondiente de dextrano-ácido bencidin-2,2-disulfónico reticulado, reemplazando la SEPHAROSE 4B usada en la preparación de su gel de bencidina-agarosa reticulado por la cantidad de dextrano correspondiente.



En general la solución amortiguadora específica usada en cualquiera de los ejemplos como disolvente para el producto tisular sanguíneo animal inicial, o cualquier adsorbato, o cualquier precipitado, puede ser reemplazada por cualquier otra solución amortiguadora acuosa que sea compatible con el producto tisular sanguíneo inicial, adsorbato o precipitado, y proporcione el pH necesario para disolver el producto tisular, adsorbato o precipitado específicos.

La porción no adsorbida de cualquier solución de material inicial puede ser lavada de ordinario de la mezola de adsorción o columna, con un volumen solo de la solución amortiguadora inicial igual al volumen del gel usado en la mezcla o columna.

El procedimiento de la invención permite proporcionar (i) un producto de fibrinógeno que contiene entre 80 y 90% aproximadamente de fibrinógeno real, (ii) un producto de factor de coagulación VIII (FAH) de mayor pureza que la de cualquier otro producto de FAH disponible en el comercio, y (iii) el producto de factor de anticoagulación B (factor IX) más puro.

Esto proporciona una ventaja valiosa, reduciendo muy marcadamente la cantidad de líquido que contiene cualquiera de estos tres factores de coagulación que ha de ser administrado a un paciente, con la



consecuencia de que no sólo se ahorra en el coste, sino que también se reduce el dolor al paciente. Por ejemplo, el producto de FAH preparado a partir de plasma fresco mediante el método de los Ejemplos 2 y 16 se encuentra disponible en una concentración de 30 unidades de FAH por ml. Esto permite la administración de una dosis muy efectiva sencillamente como una inyección ordinaria mediante una jeringuilla manual y elimina la necesidad de una infusión continua prolongada desde un frasco de infusión suspendido.

Aun cuando la invención ha sido explicada mediante descripción detallada de ciertas realizaciones específicas de ella, ha de comprenderse que pueden efectuarse diversas modificaciones o sustituciones en cualquiera de las mismas, dentro de la extensión de las reivindicaciones que se acompañan, que están destinadas también a cubrir equivalentes de las realizaciones específicas.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 19 de Junio de 1973, bajo el N° 371.491, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25



REIVINDICACIONES

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:

1ª.- Un método de aislamiento de uno al menos de los factores de coagulación de la sangre: fibrinógeno, factor VIII antihemofilia y factor B, partiendo de un producto tisular sanguíneo animal que contiene por lo menos una cualquiera de los dos, fibrinógeno y el factor B, cuyo método comprende poner en contacto un agente de adsorción de matriz de un gel insoluble en agua seleccionado entre sulfato de dextrano-dextrano reticulado, sulfato de dextrano-agarosa reticulado, sulfato de dextrano epiclorhidrina-agarosa reticulado, sulfato de dextrano agarosa reticulado con epiclorhidrina, sulfato de condroitina reticulado, heparina-agarosa reticulado, heparina reticulada, ácido bencidin-2,2-disulfónico-agarosa reticulado y ácido bencidin-2,2-disulfónico-dextrano reticulado, con dicho producto tisular sanguíneo animal disuelto en un medio acuoso, por otra parte inerte para el contenido allí disuelto del citado producto tisular sanguíneo.

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª,



en el que dicho producto tisular sanguíneo animal es sangre.

3ª.- Un método según la reivindicación 2ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo es sangre humana.

4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo es o plasma fresco o plasma antiguo, o una fracción de plasma.

5ª.- Un método según la reivindicación 4ª, en el que dicho factor adsorbido es el factor B y dicho agente de adsorción es heparina-agarosa reticulado.

6ª.- Un método según la reivindicación 5ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo es una fracción de plasma.

7ª.- Un método según la reivindicación 5ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo se selecciona entre fracción I-0 de Cohn, pasta de fracción I de Cohn, o fracción III de Cohn (método 6).

8ª.- Un método según la reivindicación 4ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo contiene fibrinógeno y el factor antihemofilia, y el fibrinógeno se adsorbe desde él sobre dicho agente de adsorción, y el método comprende además separar el agente de adsorción de matriz de gel que contiene dicho adsorbato de fibrinógeno, del resto no adsorbido de la so-

Be



-3

lución de dicho producto tisular sanguíneo, y separar el factor antihemofilia de dicho resto de dicha solución.

5 9ª.- Un método según la reivindicación 8ª,
en el que dicho producto tisular sanguíneo es pasta de
fracción I de Cohn y se disuelve en una solución acuosa
de una solución amortiguadora, de sales inorgánicas,
disolvente de dicha pasta a un pH de 6,8 aproximadamente,
y la matriz de gel de agente de adsorción es sulfato
10 de dextrano agarosa tratada con epiclorhidrina, reticulado,
y el factor antihemofilia se separa de dicho resto no adsorbido de la solución de dicha pasta, mediante adición de citrato de sodio a un pH de 7,1 aproximadamente, el factor antihemofilia precipitado se separa
15 de dicha solución acuosa, y el fibrinógeno se separa de dicho agente de adsorción de matriz de gel mediante elución con una solución acuosa de cloruro sódico de concentración comprendida entre 1 M aproximadamente y 2 M aproximadamente.

20 10ª.- Un método según la reivindicación 4ª,
en el que dicho producto tisular sanguíneo contiene factor B de coagulación y se disuelve en una solución amortiguadora acuosa disolvente de dicho producto tisular,
a un pH comprendido entre 7 y 8,4 aproximadamente, y dicho método comprende además separar el agente de adsor-
25

Reg



ción de matriz de gel que contiene dicho adsorbato de factor B y separar dicho factor B de dicho agente de adsorción eluyendo el factor mediante elución de gradiente, con una solución amortiguadora acuosa de pH 5
5 aproximadamente, y aumentando continuamente la concentración iónica de dicha solución amortiguadora.

11ª.- Un método según la reivindicación 10a, en el que dicho factor B de coagulación de la sangre se separa de dicha solución de eluato dializando el soluto
10 dializable allí disuelto, y liofilizando el residuo de diálisis.

12ª.- Un método según la reivindicación 11ª, en el que dicho agente de adsorción de matriz de gel es heparina-agarosa reticulada.

13ª.- Un método según la reivindicación 11ª, en el que dicho producto tisular sanguíneo es una fracción de plasma y dicha solución amortiguadora acuosa
15 disolvente de ella contiene un inhibidor de proteasa soluble en agua, inerte para dicha fracción de plasma y los solutos disueltos en dicha solución amortiguadora.
20

14ª.- Un método según la reivindicación 13ª, en el que dicho inhibidor de proteasa es p-aminobenzamida.

15ª.- Un método según la reivindicación 10ª, en el que dicha solución amortiguadora acuosa disolvente
25

Rey



está compuesta por tris(hidroximetil)aminometano 0,02 M, citrato 0,01 M, y NaCl 0,15 M y proporciona un pH de 8,4 aproximadamente.

5 16ª.- Un método según la reivindicación 4ª,
en el que dicho producto tisular sanguíneo es plasma y
contiene fibrinógeno, factor antihemofilia y factor B
de coagulación, y dicho plasma sanguíneo se disuelve en
una solución amortiguadora acuosa disolvente para él y
que proporciona un pH de 7 a 8,4 aproximadamente; y cu-
10 yo método comprende además separar dicho agente adsor-
bente de matriz de gel de la mayor parte no adsorbida
del plasma, separar el adsorbato de factor B de coagu-
lación de dicho agente de adsorción mediante elución de
gradiente con una solución amortiguadora compatible, de
15 pH 5, y aumentando continuamente su concentración iónica
desde 0,01 M a 2 M aproximadamente, de una sal inorgá-
nica soluble en agua, compatible, separar las sales dia-
lizables del eluato mediante diálisis y liofilizar el
residuo de diálisis de factor B; cambiar la solución
20 amortiguadora alcalina en dicha mayor parte no adsorbi-
da del plasma a una solución amortiguadora de pH 6,8 y
poner en contacto la solución que resulta que contiene
el fibrinógeno y el factor antihemofilia con uno de di-
chos agentes de adsorción de matriz de gel durante un
25 tiempo suficiente para que éste adsorba el fibrinógeno

Re



de dicha solución, separar dicho agente de adsorción
últimamente citado que contiene su adsorbato de fi-
brinógeno, del nuevo resto no adsorbido de dicha so-
lución tisular, separar el fibrinógeno de dicho agente
5 de adsorción mediante elución con una solución acuosa
de cloruro sódico de concentración desde 0,001M aproxi-
madamente a 2 M aproximadamente; y mezclar citrato só-
dico a un pH de 7,1 aproximadamente, con dicha solu-
ción restante no adsorbida para precipitar con ello el
10 factor antihemofilia.

17ª.- Un método según la reivindicación 1ª,
en el que dicho producto tisular sanguíneo se pone en
contacto con dicho agente de adsorción de matriz de gel
insoluble en agua, durante un tiempo suficiente para
15 que dichos fibrinógeno o factor B sean adsorbidos por
dicho agente de adsorción; usándose dicho agente de
adsorción en una cantidad suficiente para adsorber por
lo menos el 15 por ciento aproximadamente de dichos
fibrinógeno o factor B.

20 18ª.- "UN METODO DE AISLAMIENTO DE UNO AL
MENOS DE LOS FACTORES DE COAGULACION DE LA SANGRE: FI-
BRINOGENO, FACTOR VIII ANTIHEMOFILIA Y FACTOR B".

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que

pg

-3 JUL 

antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta y cinco
hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid,
P.A.

-3 JUL. 1974

Oscar de Elzaburu
Per Post. *Ortiz*

10

15

20

25

Res

21-6-74

I F-T.

- 45 -