

18 JUN. 19



427385

Int. Cl.: AGAK

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita, a favor de la firma
BAXTER LABORATORIES, INC., de nacionalidad estadounidense,
domiciliada en Morton Grove, Illinois 60053 (Estados Unidos)
y que ha de recaer sobre "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE UNA FRACCION DE SANGRE QUE CONTENGA UNA ELEVADA CONCEN-
TRACION DE ALBUMINA Y GLOBULINAS α Y β ".

Memoria Descriptiva

El registro de patente de invención que se solicita
tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo
el territorio nacional y sus posesiones de un procedimiento
para la preparación de una fracción de sangre que contenga
una elevada concentración de albúmina y globulinas α y β ,
conforme se describe a continuación.



El invento se refiere a un método de fraccionación de la sangre. Más particularmente, el invento se refiere a un método de fraccionamiento del Precipitado Cohn IV-4 para eliminar los factores de coagulación y los lípidos residuales y para preparar un concentrado, rico en albúmina, transferrina y otras globulinas α y β , adecuado para administración intravenosa.

El precipitado Cohn IV-4 es una fracción de sangre obtenida en el fraccionamiento principal del plasma por el Método 6 de Cohn, J. Amer. Chem. Soc., Vol. 68, pag. 459-75 (1.946); Kirk-Othmer, Encyl. of Chem. Tech., Vol. 3, pag. 584-88 (29^a ed. 1.964).

El Precipitado Cohn IV-4 consiste principalmente en albúmina, conjuntamente con algunas globulinas α y β . Además, la actividad esterasa del plasma y una parte del hipertensinógeno y de la transferina de las globulinas se encuentran en esta fracción. Lípido y ciertas cantidades de factores de coagulación residuales (principalmente protombina), están igualmente presentes en el Precipitado Cohn IV-4.

El Precipitado Cohn IV-4 encuentra una utilización como agentes de expansión volumétrico del plasma. Para esta utilización se desea obtener un producto exento de factores de coagulación y de lípidos y rico en albúmina.

Por consiguiente, un objeto del invento consiste en proporcionar un método de fraccionamiento del Precipitado Cohn IV-4 para eliminar los factores de coagulación y los lípidos residuales y para preparar un concentrado, rico en albúmina, tranferina, y otras globulinas α y β , adecuado para administración intravenosa.

De acuerdo con la práctica del invento, los factores

18 JUN. 1957



de coagulación y los lípidos residuales se eliminan del Precipitado Cohn IV-4 mediante adsorción con fosfato de calcio y fibrinógeno y, a continuación, se concentra todavía más el producto mediante Precipitación con ciertos copolímeros en bloque que son productos de condensación del etileno óxido-propileno glicol.

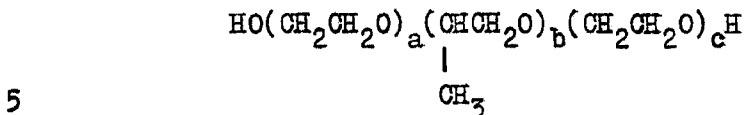
Para facilitar la eliminación de los factores de coagulación y de los lípidos del Precipitado Cohn IV-4, es preferible hacer una suspensión del material inicial en una solución acuosa, y preferentemente en una solución salina fisiológica normal (0,9% NaCl), hasta una concentración de proteína incluida entre 1 y 2% aproximadamente.

La adsorción con fosfato de calcio se realizó ajustando el pH del Precipitado Cohn IV-4 nuevamente en suspensión en una gama de aproximadamente 6,5 - 7,5 y mezclando cuidadosamente con aproximadamente 0,5 - 2% de fosfato de calcio. El fosfato de calcio preferido es el fosfato de tricalcio que tiene la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$. El precipitado resultante se separa de la mezcla, por ejemplo por centrifugación, y se desecha. A continuación se añade fibrinógeno al líquido flotante que permanecerá hasta una concentración de aproximadamente 0,05 - 0,2% y se mezcla cuidadosamente en la suspensión. A continuación se conserva la mezcla restante para fraccionamiento con los copolímeros en bloque.

Los productos de condensación de etileno óxido-propileno glicol utilizados, tales como los copolímeros en bloque del invento, pueden ser preparados por condensación del óxido de etileno con polímero de polióxipropileno. En la Patente de los Estados Unidos número 2.674.619 se da una des-

18 JUN. 1974
PATENT OFFICE
MEXICO

cripción más completa de la preparación de estos copolíme-
ros en bloque. Estos copolímeros en bloque pueden ser re-
presentados por la fórmula estructural siguiente:



10

Para las necesidades del invento, estos copolíme-
ros en bloque contienen convenientemente por lo menos 50%
de óxido de etileno en la molécula y el peso de base mole-
cular hidrofóbico del polioxipropileno es por lo menos de
15

950. Los materiales que contienen menos de 50% de óxido
de etileno y los productos cuyo peso molecular de base hi-
drofóbica es inferior a 950 no presentan la solubilidad y
las características no tóxicas deseadas. Al respecto, los
copolímeros en bloque utilizados en el invento están reali-
zados con, e incluyen, materiales utilizados como sustitua-
tos del plasma sanguíneo y materiales utilizados para ali-
mentar el aparato corazón-pulmón descrito en las Patentes
de los Estados Unidos Núms. 3.450.502, 3.577.522 y 3.590.125,
que se incorporan aquí a título de referencia.

20

Unos ejemplos ilustrativos de copolímeros en bloque
adecuados son los polioles "PLURONIC" F-38 y F-68 comercia-
lizados por la Wyandotte Chemicals Corp. El F-38 contiene
80% de unidades hidrofílicas de polioxietileno en la molécula
y la base hidrofóbica del polioxipropileno tiene un peso mo-
25

lecular de 950. El F-68 contiene también 80% de unidades hi-
drofílicas de polioxietileno en la molécula, pero la base
hidrofóbica tiene un peso molecular de 1750. El peso mole-
cular total de estos dos polioles "PLURONIC" es de 4750 y
8750, respectivamente. Se encuentra una descripción más com-
30

pleta de estos polioles en el boletín de la Wyandotte Chemi-

18 JUN. 197



cal Corp. "The Pluronic Grid", Sexta Edición que se incorpora aquí a título de referencia.

5 La precipitación con los copolímeros en bloque que anteceden se realiza a dos niveles de concentración diferentes, cada uno con un pH diferente. En primer lugar, la mezcla conservada procedente del tratamiento con fibrinógeno y fosfato de calcio se ajusta para un pH de 6-7 y se mezcla cuidadosamente con el copolímero en bloque hasta una concentración incluida entre 13,5 y 17,5%, aproximadamente. A continuación, se prepara el precipitado resultante de la mezcla, por ejemplo mediante centrifugación, y se conserva el material flotante. En segundo lugar, este último material flotante se mezcla cuidadosamente con el copolímero en bloque hasta obtener una concentración final incluida entre 18% y 15 20% aproximadamente. A continuación se enfría la suspensión hasta 3-5^oC aproximadamente, se ajusta el pH entre 4 y 5 con una solución tampón de acetato (0,8 mol de acetato de sodio, 4 mols de ácido acético normal, pH 4) y se mezcla de nuevo la suspensión cuidadosamente. El precipitado resultante se separa^a/continuación, por ejemplo mediante centrifugación, y se conserva, ya que constituye el Precipitado Cohn IV-4 purificado deseado.

25 En un modo de realización preferido del invento, el material flotante conservado, procedente del tratamiento con fibrinógeno y fosfato de calcio, se trata inicialmente con el copolímero en bloque a un tercer nivel de concentración para precipitar el quininógeno. Esta proteína puede liberar bradiquina, la cual a su vez es conocida por sus propiedades de reducción de la presión de la sangre. El quininógeno se elimina mediante mezclado cuidadoso del material flotante

30



te restante con el copolímero en bloque a una concentración
incluída entre 4% y 6% aproximadamente, con un pH de aproxi-
madamente de 4-5. Se separa de la mezcla el precipitado resul-
tante, por ejemplo mediante centrifugación, y el material
5 flota ; se conserva para su tratamiento con el copolímero
en bloque a los dos niveles de concentración superiores, como
más arriba.

Los siguientes ejemplos ilustrarán más completamente
el invento, aunque éste no se limite a estos ejemplos parti-
10 culares.

EJEMPLO I

Se pone en suspensión una pasta de Fracción Cohn
IV-4 en una solución salina fisiológica normal (0,9% NaCl)
hasta obtener una concentración de 1,5 g% (gramos 100/mL.)
15 si se mantiene el pH en 7. Se añade fosfato de tricalcio
 $[Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6]$ hasta obtener una concentración de 1,5
g % y la suspensión se mezcla cuidadosamente durante 60
minutos a la temperatura ambiente (25°C aproximadamente). A
continuación se centrifuga la mezcla y se desecha el pre-
20 cipitado. Sucesivamente, se añade fibrinógeno al material
flotante conservado hasta una concentración de 0,1 g %
y se continua la operación de mezclado durante otros 60 mi-
nutos a la temperatura ambiente. A continuación se conser-
va la mezcla para la siguiente fase.

25 El pH de la mezcla conservada se ajusta en 6,5 y se
añade "PLURONIC" F-38 hasta una concentración de 17 g %.
La suspensión se mezcla durante 1,5 horas a la temperatura
ambiente y se centrifuga. Se desecha el precipitado y se
añade a continuación "PLURONIC" F-38 al material flotante
30 para aumentar su concentración hasta 19 g %. Se mezcla



la suspensión durante 1,5 horas a la temperatura ambiente y se enfría a continuación a 4°C. Se ajusta el pH en 4,5 con una solución tampón de acetato (0,8 mol de acetato de sodio en 4 mols de ácido acético normal, pH 4). El mez-

5 clado se prosigue durante 30 minutos a 4°C y se centrifuga la mezcla. El precipitado resultante se separa del material flotante y se pone en suspensión en agua destilada hasta obtener una concentración de proteína de 4 g %, ajustándose el pH en 7,2. El producto nuevamente en suspensión se

10 conserva, ya que constituye la Fracción Cohn IV-4 purificada que se desea.

El producto purificado que antecede se ajusta para un contenido de electrolito de 140 meq de Na⁺, 4,5 meq de K⁺, y 100 meq de Cl⁻ por litro. A continuación, se añaden

15 como estabilizante 0,004 M de caprilato de sodio y 0,004 M de acetiltriftofanato; se calienta el producto a 60°C durante 2 horas, se clarifica por filtración a través de placas de asbestos, se filtra en condiciones estériles a través de filtros de membrana "Millipore" de 0,22 μ, y se calienta a

20 60°C durante otras dos horas.

El producto final preparado según el ejemplo que antecede contiene aproximadamente 50-60% de albúmina, 10-12% de transferina y 20-30% de globulinas α y β. La actividad de trombina es inferior a 0,003 μ por mililitro. Cuando

25 se ajusta a una concentración de proteína de 4%, el producto final tiene una osmolaridad similar a la de la solución de albúmina al 5%.

EJEMPLO 2

Una pasta de Fracción Cohn IV-4 se disuelve en una

30 solución salina fisiológica normal hasta una concentración

18 JUN. 1974



de 1-1,5 g %, aproximadamente, y se ajusta al pH en $7,2 \pm 0,1$. A continuación se añaden aproximadamente 0,5 g % de fosfato de tricalcio y la suspensión se mezcla durante 30 minutos aproximadamente a la temperatura ambiente. Se centrifuga la mezcla y se desecha el precipitado resultante. El material flotante conservado se mezcla con una solución de fibrinógeno hasta conseguir una concentración de aproximadamente 0,05 g % durante 1-2 horas a la temperatura ambiente.

A continuación se enfría la suspensión a 5°C y se ajusta el pH en 6,5 con 1N HCl. Se añade "PLURONIC" F-38 hasta obtener una concentración de 14 g %, se mezcla la suspensión durante 1-2 horas a 5°C y se centrifuga. Se desecha el precipitado y se filtra el material flotante. A continuación se ajusta el filtrado para una concentración de "PLURONIC" F-38 de 19 g % y un pH de $4,5 \pm 0,1$ con una solución tampón de acetato. La suspensión se mezcla durante 1-2 horas, se centrifuga a 5°C y se conserva el precipitado resultante que constituye la fracción Cohn IV-4 purificada que se desea obtener.

El precipitado conservado que antecede se pone en suspensión en agua destilada hasta una concentración de $4,0 \pm 0,3$ g % de proteína; se ajusta el contenido de electrolito (Na^+ , K^+ , Cl^-) para que sea el contenido del plasma normal, y se ajusta el pH en $7,2 \pm 0,2$. A continuación se calienta la suspensión durante 2 horas a 60°C , en presencia de un agente estabilizante constituido por caprilato de sodio y acetiltriftofanato; se clarifica mediante filtración a través de placas de asbestos, se filtra en condiciones estériles a través de filtros de membrana "Millipo-



re" de 0,22 μ y a continuación se calienta a 70°C durante otras 10 horas. El producto final se distribuye en cantidades de 250 mililitros.

EJEMPLO 3

5 Una pasta de Fracción Cohn IV-4 se disuelve en una solución salina fisiológica normal, se adsorbe en fosfato de tricalcio y se trata con fibrinógeno como en el Ejemplo 2.

10 A continuación se ajusta el pH de la suspensión en 4,6 con 1N HCl y se añade "PLURONIC" F-38 hasta obtener una concentración de 5%. Después de mezclar durante una hora a la temperatura ambiente, se centrifuga la mezcla y se desecha el precipitado. A continuación se ajusta la concentración de polímero "PLURONIC" en 17% con un pH de 6,5 y se
15 mezcla la suspensión durante 1-2 horas. El precipitado obtenido por centrifugación se desecha y se ajusta el material flotante conservado hasta una concentración de polímero "PLURONIC" de 19%. Después de mezclar durante 1 hora, se enfría la suspensión a 5°C, y se ajusta el pH en 4,5 \pm
20 0,1 con una solución tampón de acetato. Se continua el mezclado durante otra hora y a continuación se centrifuga la suspensión a 5°C. Se realiza una suspensión de precipitado en agua destilada, se ajusta la concentración de electrolito a la del plasma y se trata el producto mediante el calor como en el Ejemplo 2. Se ha comprobado que el producto está exento de actividad tipo quinina al ser administrado
25 in vivo por infusión en perros. No se observó ningún efecto de reducción de la presión sanguínea con este producto aunque se observó una reducción de la presión de la sangre con otro producto que era el mismo salvo que no había sido
30

18 JUN.



tratado con el polímero "PLURONIC" al nivel de 5%.

EJEMPLO 4

5 Se repitieron los Ejemplos de Los procesos 1, 2 y 3 salvo que se utilizó en lugar de "PLURONIC" F-38 una cantidad equivalente de "PLURONIC" F-68 con resultados sustancialmente similares.

10 Los peritos en la materia podrán imaginar otros ejemplos y modificaciones de los ejemplos que anteceden sin alejarse del espíritu^y/del alcance del invento. Dichos ejemplos y modificaciones están todos incluidos en el alcance de las reivindicaciones que siguen.

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

15 NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de la firma BAXTER LABORATORIES, INC., con domicilio en Morton Grove, Illinois 60053 (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

20 1.- Procedimiento para la preparación de una fracción de sangre que contenga una elevada concentración de albúmina y globulinas α y β adecuada para administración intravenosa, que consiste en fraccionar el precipitado Cohn IV-4 mediante su mezcla íntima con 0,5% a 2% aproximadamente
25 de fosfato de calcio; separar de éste el precipitado resultante y mezclar cuidadosamente el material flotante conservado con aproximadamente 0,05% a 0,2% de fibrinógeno, y mezclando cuidadosamente a continuación con un copolímero en bloque de óxido de etileno y de polímero de polioxipropileno que contenga por lo menos aproximadamente 50% de

30 *Reg*



5 óxido de etileno en la molécula y que tenga un peso molecular de base hidrofóbica de polioxipropileno igual por lo menos a 950, hasta conseguir una concentración incluida entre 13,5% y 17,5% aproximadamente, con un pH de aproximadamente 6-7; separar el precipitado resultante; mezclar cuidadosamente el material flotante conservado con dicho copolímero en bloque, hasta una concentración de 18 a 20% aproximadamente, con un pH de aproximadamente 4-5, y recuperar el precipitado resultante conservándolo como fracción de sangre deseada.

10

2.- Procedimiento para la preparación de una fracción de sangre que contenga una elevada concentración de albúmina y globulinas α y β , según la reivindicación 1, caracterizado porque el copolímero en bloque contiene aproximadamente 80% de unidades hidrofílicas de polioxietileno en la molécula y porque la base hidrofóbica del polioxipropileno tiene un peso molecular de aproximadamente 950.

15

3.- Procedimiento para la preparación de una fracción de sangre que contenga una elevada concentración de albúmina y globulina α y β , según la reivindicación 1, caracterizado porque incluye la fase suplementaria que consiste en eliminar la actividad tipo quinina de la fracción de sangre mediante la mezcla íntima inicial del material flotante conservado procedente del tratamiento realizado con fibrinógeno y fosfato de calcio, con dicho copolímero en bloque, hasta una concentración incluida entre 4 y 6% aproximadamente y a un pH de aproximadamente de 4-5, separar el precipitado resultante y conservar el material flotante para su tratamiento con dicho copolímero en bloque a los dos niveles de concentración más elevados.

20

25

30 *Rey*



4.- Procedimiento para la preparación de una fracción de sangre que contenga una elevada concentración de albúmina y globulinas α y β , según la reivindicación 3, caracterizado porque el copolímero en bloque contiene aproximadamente 80% de unidades hidrofílicas de polioxietileno en la molécula y la base hidrofóbica de polioxipropileno tiene un peso molecular de aproximadamente 950.

5.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA FRACCION DE SANGRE QUE CONTENGA UNA ELEVADA CONCENTRACION DE ALBUMINA Y GLOBULINAS α Y β ".

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

Madrid, 18 de junio de 1.974.

P.A. de BAXTER LABORATORIES, INC.

Victor Gil Vega: