

27 NOV.



P.- 58.923

Hoe73/B019

... AG 35/14 // G01N 33/16-

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

431736

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN AGENTE PARA
DIAGNOSTICO PARA EL PROPOSITO DE EFECTUAR EL CONTROL
DE LA CAPACIDAD DE COAGULACION DE LA SANGRE"

(Clase Internacional A61k, G01n)

77 NOV 1974



El invento se refiere en primer término a un agente para diagnóstico para el propósito de controlar la capacidad de coagulación de la sangre, que consta de trombo-
plastina, que se ha obtenido a partir de tejido trombógeno
5 de origen animal o humano, especialmente de tejido de pla-
centas humanas, y de iones calcio.

El invento concierne además a la preparación de una trombo-
plastina normalizada sensible al factor VII y al
factor X, a partir de tejido trombógeno.

10 Finalmente, el invento concierne también a un es-
tabilizador para trombo-
plastina que contiene iones calcio.

Un ensayo exploratorio acerca de perturbaciones en el sistema exógeno de coagulación lo constituye el ensayo de tiempo de coagulación de una sola fase de acuerdo con Quick, comunicado por primera vez en 1937. La función del sistema de coagulación exógeno, que se basa en una coope-
15 ración de los factores de coagulación VII, X, V, II y I, es determinada por adición de un extracto de tejido nor-
malizado obtenido a partir de órganos de animales de san-
20 gre caliente, designado como trombo-
plastina. Bajo la ac-
ción de la trombo-
plastina es activado el factor de coagu-
lación VII (proconvertina), que transforma al factor X
(factor de Stuart-Prower) en su forma activa. En presencia
de iones calcio se forma un complejo activo de enzima y
25 lípidos a base de fosfolípidos y los factores de coagula-

-7 NOV



5 ción X y V activados (acelerina), que a su vez transforma al factor II (protrombina) en su forma activa, la trombina. El factor I (fibrinógeno) del plasma es transformado en fibrina proporcionalmente a la velocidad de formación de la cantidad de trombina. El tiempo de coagulación medido de este modo de un plasma de ensayo, en segundos, es utilizado para la evaluación de la capacidad de coagulación.

10 El índice denominado de Quick es apropiado para descubrir estados congénitos o adquiridos de déficit de los factores que participan en el sistema de coagulación exógeno. Además, mediante medición del tiempo de coagulación de una sola fase, es posible efectuar una vigilancia de la terapia con anticoagulantes por vía oral. Para la tromboplastina, empleada con este fin, un criterio de calidad esencial consiste en que ésta debe estar libre de 15 los factores de coagulación del sistema exógeno, especialmente debe estar libre de trombina, pero que, por otro lado, debe manifestar una elevada sensibilidad frente a estos factores.

20 Procedimientos para la preparación de tromboplastina con alta actividad han sido descritos varias veces en la bibliografía. En parte, se utilizan para ello placentas humanas en calidad de material de partida. No obstante, hasta el momento no era sabido que tromboplastinas sensibles al factor VII y al factor X pudieran obtenerse a par- 25

-7 NOV.



tir de tejido trombógeno, especialmente a partir de placentas.

5 En los procedimientos conocidos para la obtención de tromboplastina a partir de tejidos de placentas recientemente lavados, se utiliza en general una extracción acuosa. Otros procedimientos para la obtención de la tromboplastina consisten en la extracción de los productos homogeneizados de tejido con ayuda de etanol acuoso o de fenol. En todos 10 estos procedimientos, los valores de pH son mantenidos desde neutros hasta débilmente alcalinos. No obstante, los preparados de tromboplastina obtenidos de acuerdo con estos procedimientos, a pesar de haber sido sometidos a diferentes medidas estabilizadoras, tales como tratamiento con luz ultravioleta o por almacenamiento con exclusión 15 del aire, sólo pueden ser almacenados y empleados de manera limitada. No están completamente libres de trombina y, especialmente, no son suficientemente sensibles frente a los factores VII y X, para garantizar diferenciaciones exactas entre cuadros de coagulación normales y cuadros de coagulación patológicos. 20

25 Se ha encontrado ahora que no aparecen las mencionadas desventajas de los preparados de tromboplastina en el caso de utilizarse un agente para diagnóstico para el propósito de efectuar el control de la capacidad de coagulación de la sangre, que contiene tromboplastina e io-



nes calcio, el cual está caracterizado por tener un contenido de tromboplastina, libre de trombina, sensible al factor VII y al factor X, que había sido extraída desde una suspensión acuosa de tejido trombógeno lavado hasta quedar libre de sangre, con un valor de pH entre 10 y 12, durante un tiempo desde 15 minutos hasta 48 horas a 30°C hasta 1°C, habiéndose de asociar debidamente el tiempo de extracción más corto a la temperatura más elevada y el tiempo de extracción más largo a la temperatura más baja, y también entre sí los valores situados entre medias, y que después de un tratamiento en el margen de pH débilmente ácido, había sido separada del tejido.

Se obtiene una tromboplastina especialmente sensible si la extracción se efectúa con un valor de pH entre 11,4 y 11,8, preferiblemente en las combinaciones de temperatura y tiempo de 15 minutos a 30°C, de 30 minutos a 22°C, o de por lo menos 20 horas a 4°C, y el tejido es tratado ulteriormente antes de la separación de la solución de extracción con valores de pH de 4,5 a 7,0, preferiblemente de pH 6,0 a 6,4.

A la tromboplastina obtenida de este modo se añaden iones calcio en forma de una sal de Ca soluble en agua, de modo ventajoso cloruro de calcio.

Se ha encontrado además que se puede lograr una sobresaliente estabilidad en almacenamiento del agente para

7 NOV. 1978



5 diagnóstico por adición de un ácido colánico, preferible-
mente ácido desoxicólico o ácido cólico, y de una sal solu-
ble en agua de un metal pesado, tales como sales de
 UO_2^{++-} , Zn^{++-} y Ni^{++} , especialmente una sal de manganeso
divalente, preferiblemente cloruro de manganeso divalente.

10 Se logra una estabilidad especialmente buena,
que hace apropiado al reactivo para diagnóstico también
para el secado por congelación (liofilización), mediante
adición de un alcohol de azúcar, especialmente mannita o
sorbita, o de monosacáridos o disacáridos.

15 Se establece una proporción ponderal óptima de
los aditivos mediante mannita: ácido desoxicólico : cloruro
de manganeso divalente = 300 : 3 : 1, presentándose el clo-
ruro de manganeso divalente en la solución en una concen-
tración desde 10^{-3} hasta 10^{-4} molar, preferiblemente
 5×10^{-4} molar.

20 Tal agente para diagnóstico, fácilmente resus-
pendible en agua destilada, es plenamente activo durante
un almacenamiento en forma de solución a $37^{\circ}C$ por un tiem-
po hasta de 10 horas, y es estable durante por lo menos
2 días a $20^{\circ}C$. En la forma secada por congelación, con un
almacenamiento en nevera (aproximadamente a $4^{\circ}C$) no se pue-
de comprobar a lo largo de 2 años ninguna disminución de
actividad.

25 Las tromboplastinas sensibles al factor VII más

27 NOV. 1974



activas se pueden obtener a partir de cerebro humano. Un material más fácilmente asequible que también contiene tromplastinas de alta actividad, lo constituyen placentas humanas. En el orden de sucesión de actividad decreciente de tromboplastina se mencionarán, además, cerebro de mono, cerebro de conejo, pulmones de conejo, cerebro de ganado vacuno y de ganado porcino.

De acuerdo con el presente invento se obtiene un agente para diagnóstico que permite, por ejemplo, de acuerdo con el siguiente método, una determinación del tiempo de coagulación de una sola fase de acuerdo con Quick:

0,1 ml de un plasma de citrato o de oxalato a investigar fisiológicamente en cuanto a coagulación, es introducido con pipeta en un tubito de ensayo previamente calentado a 37°C. Después de un tiempo de incubación de 30 segundos se añaden 0,2 ml de la suspensión acuosa, también calentada de modo previo, de la tromboplastina cálcica obtenida de acuerdo con el invento a partir de placentas humanas, y se determina la iniciación de la coagulación comenzando desde este momento. El tiempo de coagulación, así obtenido, del plasma del sujeto sometido a ensayo es puesto en relación con un tiempo de coagulación de un plasma en forma de mezcla de por lo menos 5 donantes sanos. Para ello, el plasma mezclado es incubado en estado



sin diluir, y además en diluciones de 1:2, de 1:4 y de 1:10 del mismo modo a como se describe para el plasma del sujeto sometido a ensayo, con la tromboplastina cálcica de acuerdo con el invento, y los tiempos de coagulación resultantes son asociados como abscisas a los valores recíprocos de las diluciones como ordenadas, de donde se produce una curva patrón de mucha pendiente y rectilínea. Partiendo del tiempo de coagulación del plasma del sujeto sometido a ensayo en las abscisas, se determina el punto de intersección sobre la curva patrón y se lee en las ordenadas el correspondiente valor recíproco. Mediante subsiguiente cálculo se calcula el valor porcentual del tiempo de coagulación del plasma del sujeto sometido a ensayo en relación con un plasma mixto normal:

1: valor del tramo de ordenadas x 100 = Valor porcentual de la actividad de coagulación como valor porcentual de la actividad normal.

Si, por ejemplo, las diluciones de plasma de un plasma mixto normal, indicadas en la siguiente tabla, se asocian a los tiempos de coagulación resultantes, se puede producir la curva patrón.

25



Dilución de plasma	Concentrado:	1:2	1:4	1:10 ⁻
Tiempos de coagulación en segundos	11,5	17,0	30,4	81,3

5

Un plasma con déficit de factor VII, típico, conduce a un tiempo de coagulación de aproximadamente 58 segundos. Esto corresponde, de acuerdo con la curva patrón, a aproximadamente 12% del tiempo normal.

10

Una medida de la sensibilidad de la tromboplastina la constituye el cociente entre el tiempo de coagulación de un plasma patológico y de un plasma mixto normalizado - la denominada "relación de protrombina". Cuanto mayor se hace este cociente, tanto más apropiada es la tromboplastina para descubrir un déficit de coagulación explorado. En el caso presente la relación de protrombina resulta con un valor de aproximadamente 5. Esta relación de protrombina demuestra que el agente para diagnóstico de acuerdo con el invento es sobresalientemente apropiado para descubrir estados patológicos de coagulación especialmente de déficit de factor VII.

15

20

25

Si, de acuerdo con el invento, los agentes para diagnóstico se obtienen a partir de cerebro de conejo, pulmones de conejo, o placentas de ganado porcino, resultan para un plasma mixto normal, en la determinación del tiempo



de coagulación de una sola fase de acuerdo con Quick, los valores recopilados en la siguiente tabla:

5

	Concentrado	1:2	1:4	1:10
Cerebro de conejo	16,5	24,8	43,1	111,2
Pulmones de conejo	10,2	14,2	22,4	52,5
10 Placenta de ganado porcino	27,1	41,4	66,5	210,0

El invento se explicará seguidamente con ayuda de ejemplos.

15

Ejemplo 1.

15 kg de placentas humanas congeladas son desmenuzados mediante un aparato picador de carne. El producto homogeneizado de placentas es lavado 18 veces, cada vez con 120 litros de una solución al 0,9% de cloruro de sodio a $\pm 10^{\circ}\text{C}$, y en cada proceso de lavado se eliminan las aguas de lavado por sedimentación y por decantación. La última porción sobrenadante es entonces incolora. El producto homogeneizado de placentas lavado de este modo, es liberado de las aguas de lavado restantes por centrifuga-

25

27 NOV. 1974



5 ción durante 30 minutos a 3.000 veces la gravedad. El sedimento húmedo es secado durante 30 horas en una instalación cerrada de secado por congelación excepto una humedad residual de 5%. El rendimiento de material seco es de aproximadamente 1,5 kg.

10 1,5 kg del tejido de placentas secado y lavado hasta quedar libre de sangre, son sumergidos en 30 litros de agua destilada y desmenuzados durante 10 minutos a una temperatura de 10°C con un homogeneizador (Ultra-Turrax de la firma Janke y Kunkel, tipo 100/2 M). Después de ello se introduce, con vigorosa agitación, una cantidad de una lejía de sosa 5 N (aproximadamente 210 ml) tal que el valor del pH se ajusta a 11,5. La mezcla es agitada durante 25 minutos y luego es llevada a un vapor de pH de 6,6 por medio de adición de ácido clorhídrico 5 N (alrededor de 15 210 ml). A continuación se efectúa un segundo tratamiento de la mezcla con el aparato homogeneizador por una duración de 30 minutos. El residuo de tejido es separado en una centrífuga a 3.000 veces la gravedad. Se obtienen de este modo 20 litros de tromboplastina.

25 A porciones cada una de 1 litro de la tromboplastina se añaden 1,1 g de cloruro de calcio, 30 g de mannita, 0,3 g de ácido desoxicólico y 0,1 g de cloruro de manganeso divalente tetrahidratado. El valor del pH es ajustado exactamente a 6,3 por adición de una pequeña cantidad de

27 NOV



ácido clorhídrico o de lejía de sosa, y a continuación se seca por congelación en cargas cada una de 2,0 ml. Durante el secado por congelación la tromboplastina no experimenta ninguna pérdida de actividad.

5

Ejemplo 2

La sustancia gris de cerebro de conejo es recuperada de manera conocida y es lavada hasta quedar libre de sangre con solución al 0,9% de NaCl. El proceso de lavado es controlado mediante espectrofotometría mediante la determinación del contenido residual de hemoglobina.

Después de ello se cubren 120 g del tejido cerebral, todavía húmedo, con 400 ml de agua destilada, y se desmenuzan durante 10 minutos a 10°C con un homogeneizador de laboratorio (Janke & Kunkel). Después de ello se ajusta el valor del pH a 11,6 con NaOH 5 N con vigorosa agitación, y la mezcla se mantiene así durante 25 minutos.

A continuación se ajusta el valor del pH a 6,4 mediante HCl 5 N y se homogeneiza de nuevo, con ligero enfriamiento, con el aparato antedicho durante 30 minutos.

Luego el tejido se centrifuga a 3.000 veces la gravedad y la porción sobrenadante que contiene tromboplastina (280 ml) es recuperada por decantación.

Porciones cada una de 100 ml de la tromboplastina son mezcladas con 0,1 g de cloruro de calcio, 3,0 g de



sorbita, 30 mg de ácido desoxicólico, 14 mg de sulfato de zinc ($7H_2O$).

5 El valor del pH de la tromboplastina es ajustado exactamente a 6,3, y se seca por congelación en cargas cada una de 2 ml.

Ejemplo 3

10 240 g de placentas de ganado porcino, húmedas, lavadas hasta quedar libres de sangre, son cubiertos con 400 ml de agua destilada y son desmenuzados durante 10 minutos a 1000 con un homogeneizador de laboratorio (Janke & Kunkel). Después de ello se ajusta el valor del pH a 11,6 con NaOH 5 N, con vigorosa agitación, y la mezcla se mantiene de este modo durante 25 minutos.

15 A continuación se ajusta el valor del pH a 6,4 mediante HCl 5 N y se homogeneiza de nuevo, con ligero enfriamiento, con el aparato antedicho durante 30 minutos. Luego el tejido es centrifugado a 3.000 veces la gravedad y la porción sobrenadante que contiene tromboplastina (250 ml) es obtenida por decantación.

20 Porciones cada una de 100 ml de la tromboplastina son mezcladas con 0,1 g de cloruro de calcio, 3,0 g de manita, 0,3 g de ácido desoxicólico, 0,1 g de cloruro de manganeso divalente x 4 H_2O .

25 El valor del pH de la tromboplastina es ajustado

21 NOV 1975



exactamente a 6,3, y se seca por congelación en cargas cada una de 2 ml.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el 13 de Noviembre de 1973, con el nº P 23 56 493.4, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

- REIVINDICACIONES -

15

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:

20

1ª.- Procedimiento para la preparación de un agente para diagnóstico para el propósito de efectuar el control de la capacidad de coagulación de la sangre que contiene tromboplastina libre de trombina, sensible al factor VII y al factor X, así como iones calcio, caracterizado porque una suspensión acuosa de tejido trombó-

25

30-10-75

ME

geno es sometida primero a un valor de pH alcalino ≤ 12 y a continuación a un valor de pH débilmente ácido, y a continuación se separa del residuo de tejido el extracto que contiene tromboplastina.

5

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se extrae una suspensión acuosa de tejido trombógeno lavado hasta quedar libre de sangre con una lejía de metal alcalino, con un valor de pH entre 10 y 12, durante un tiempo desde 15 minutos hasta 48 horas a 30°C hasta 1°C, habiéndose de asociar debidamente el tiempo de extracción más corto a la temperatura más elevada y el tiempo de extracción más largo a la temperatura más baja y también entre sí los valores situados entre medias, y se separa del tejido el extracto después de un tratamiento en el margen de pH débilmente ácido.

10

15

20

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque la extracción se efectúa con un valor de pH entre 11,4 y 11,8 en las combinaciones de temperatura tiempo de 15 minutos a 30°C, de 30 minutos a 22°C o de por lo menos 20 horas a 4°C.

25

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 2ª a 3ª, caracterizado porque el tejido, antes de la separación desde la solución de extracción, es tratado ulteriormente a un valor de pH entre 4,5 y 7,0, preferiblemente entre 6,0 y 6,4.

5ª.- Procedimiento para la preparación de un agente para diagnóstico para el propósito de efectuar el control de la capacidad de coagulación de la sangre.

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

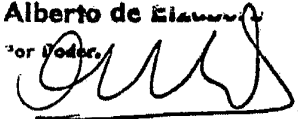
Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

01. SET. 1976

P.A.

Alberto de Elizalde
por poder.



30-8-76
VGD.