

24 DIC. 1975

443840

P.- 61.534

HOE 74/B 033

MEMORIA DESCRIPTIVA Int. Cl. 2: GOIN

para solicitar PATENTE DE INVENCION

A nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PLASMA SAN
GUINEO"

17 ENE. 1977

15-10-75

GOIN

BAD ORIGINAL

El invento concierne a un plasma sanguíneo que en lo que se refiere a sus propiedades de coagulación en sistemas de ensayo apropiados para investigaciones de coagulación manifiesta un comportamiento ampliamente inalterado y que como consecuencia de ello es apropiado como plasma patrón para investigaciones de coagulación, a un procedimiento para la preparación del mismo, y a su utilización de modo preferente en investigaciones de coagulación para diagnósticos.

5. Una llamativa propiedad de la sangre después de su salida de los vasos es su coagulación. Se pone de manifiesto, no obstante, también que los tiempos de coagulación de pacientes con determinadas enfermedades se diferencian de los tiempos de coagulación de personas normales sanas. Estas desviaciones pueden ser producidas también intencionadamente mediante determinados fármacos. Para ello es sabido que la coagulación de la sangre resulta de la cooperación de diferentes factores activadores e inhibidores. Los factores de coagulación son más o menos sensibles y su almacenamiento sin pérdida de actividad lleva aparejadas grandes dificultades. Especialmente, se pone de manifiesto que plasmas sanguíneos almacenados experimentan muy pronto alteraciones en lo que se refiere a sus parámetros de coagulación. En el caso de la vigilancia diagnóstica del estado de coagulación es

necesario poner en relación con valores patrón normalizados determinados a los valores obtenidos en los ensayos individuales de coagulación de la sangre. Como sistema de referencia es apropiado, por ejemplo, un plasma mixto de varios donantes de sangre sanos, que en cada caso se obtiene en lo posible al mismo tiempo que el plasma de la persona sometida a experimentación. Tal modo de proceder no siempre se puede llevar a la práctica en laboratorios para diagnósticos.

10 Por lo tanto se ha establecido la misión de preparar un plasma sanguíneo apto para el almacenamiento, que tenga una buena estabilidad en lo que se refiere a los factores importantes para el estado de coagulación. Pa-
15 rámetros importantes de coagulación son en este caso el tiempo de coagulación monofásico de acuerdo con Quick, el tiempo de tromboplastina parcial, el tiempo de plasmatrombina, los factores de coagulación II, V, X y XIII y finalmente el fibrinógeno.

20 Es sabido que un plasma recientemente obtenido de donantes sanos cumple suficientemente, en lo que se refiere a las propiedades de coagulación, los criterios establecidos para un sistema de referencia en el caso de investigaciones de coagulación. Igualmente, es sabido que un plasma puede ser estabilizado por liofiliza-
25 ción también en lo que se refiere a la actividad de los

factores de coagulación. No obstante, se ha puesto de manifiesto también en el caso de los plasma liofilizados que sus parámetros de coagulación se alteran de manera diferente en el transcurso del tiempo. Esto ha
5 conducido a que plasmas liofilizados, que encuentran utilización como magnitudes de referencia en investigaciones de coagulación, no pueden ser empleados para todos los parámetros de coagulación arriba indicados. En especial, se ha puesto de manifiesto que el tiempo de
10 coagulación de plasmatrombina de los plasmas liofilizados nuevamente disueltos ya no coincide con los valores a obtener de un plasma normalizado en un momento en el que los restantes factores de coagulación todavía manifiestan una coincidencia relativamente buena con valores normalizados.
15

Se ha encontrado ahora con sorpresa que un plasma sanguíneo liofilizado que es almacenado bajo un gas protector permanece estable por lo menos en lo que se refiere a los siguientes factores de coagulación que se
20 van a mencionar, si el gas protector contiene por lo menos 5%, preferiblemente de 10 hasta 50% de dióxido de carbono. Los parámetros de coagulación que entran en consideración son, especialmente, el tiempo según Quick, el tiempo de tromboplastina parcial, el tiempo de coagulación de plasmatrombina, los factores de coagulación II (protrombina),
25

V (acelerina), X (factor de Stuart-Prower), XIII (factor estabilizador de fibrina) y fibrinógeno.

5 Un objeto del invento es por consiguiente un plasma sanguineo liofilizado bajo un gas protector, que está caracterizado porque el gas protector contiene por lo menos 5%, preferiblemente de 10 hasta 50% de dióxido de carbono. Como otros constituyentes que pueden ser contenidos en el gas protector además de dióxido de carbono, se mencionan los gases conocidos con tal fin. Estos son, 10 en general, sustancias inertes que están presentes a -25°C en una fase gaseosa. A estos gases pertenecen en primer lugar nitrógeno, pero también otros gases inertes, por ejemplo los gases nobles, tal como, helio, neón ó argón. Tal como es necesario por lo general en el caso de plasmas sanguíneos, el plasma contiene el anticoagulante añadido para evitar la coagulación de la sangre, 15 por ejemplo iones oxalato o citrato en una concentración, usual en el caso de la obtención de plasma, de aproximadamente 1 parte de anticoagulante y 9 partes de sangre y eventualmente otros aditivos estabilizadores de coloides, 20 ventajosamente en forma de carbohidratos de bajo peso molecular. Estos últimos se emplean en una concentración de 1-5%.

25 Un objeto más del invento es un procedimiento para la preparación de plasma sanguíneo estabilizado, que está caracterizado porque se incorpora plasma sanguíneo liofilizado, eventualmente estabilizado, en un gas pro-

5 tector conteniendo dióxido de carbono en la concentración mencionada. En especial, el objeto del invento concierne a un procedimiento, según el cual recipientes que contienen plasma sanguíneo liofilizado son puestos en vacío y el espacio vacío de aire es llenado con dióxido de carbono.

10 En una forma de realización preferida se vierte sangre recientemente obtenida, de modo conocido, en una cantidad previamente dispuesta de un anticoagulante, mezclándose, en el caso de la utilización de citrato, por ejemplo, 1 parte en volumen de una solución 0,1 molar de citrato de sodio de pH 7,0 con 9 partes en volumen de la sangre recientemente obtenida. La sangre es centrifugada, por ejemplo a 7.500 ± 500 g (g = aceleración de la fuerza de la gravedad) durante 20 - 40 minutos, preferiblemente 30 minutos, y el plasma situado sobre los glóbulos sanguíneos es decantado y mezclado eventualmente con sustancias estabilizadoras. Después de ello el plasma es llenado en recipientes de vidrio no humedecibles, ventajosamente en recipientes de vidrio siliconizados o en correspondientes recipientes de material sintético, procurándose que la cantidad de plasma introducida sólo llene aproximadamente $1/3 - 1/10$ del volumen total del recipiente. El plasma es congelado en los recipientes con la mayor superficie posible - esto puede lograrse ventajosamente mediante congelación rotatoria - y finalmente es secado. Los recipientes que contienen el plasma seco son puestos en vacío, habiéndose manifestado como ventajoso aplicar un

15

20

25

vacío de 10^{-3} hasta 10^{-4} Torr y mantener los plasmas en vacío durante 2-5 horas, preferiblemente 3-4 horas, a continuación llenar el espacio vacío de aire con un gas protector conteniendo dióxido de carbono y finalmente cerrar de manera estanca al aire los recipientes.

Tal como es sabido el mecanismo de coagulación es fundamentalmente similar con todos los animales vertebrados, de manera que no existe ninguna razón de impedimento para estabilizar cada plasma de animales vertebrados en la forma descrita en lo que se refiere a los parámetros de coagulación, de modo correspondiente a la finalidad de utilización pretendida. En la técnica de diagnóstico clínico existe no obstante una necesidad de plasmas humanos con parámetros normalizados de coagulación, de manera que se puedan utilizar, como material de partida para el plasma liofilizado de acuerdo con el presente invento, de modo preferible plasmas sanguíneos humanos. Especialmente se mezclan plasmas sanguíneos obtenidos de donantes sanos y se estabilizan de acuerdo con el invento. No obstante, no existe ninguna razón de impedimento para someter a tratamiento del mismo modo plasmas de personas sometidas a experimentación con perturbaciones definidas de la coagulación, con el fin de poder utilizarlos como un sistema de referencia estable para la determinación o la detección de una correspondiente

perturbación de la coagulación.

5 Ya antes de ahora se añadían a los plasmas sanguíneos o sueros sustancias estabilizadoras, especialmente para la estabilización de las proteínas de plasma sanguíneo, preferiblemente en forma de carbohidratos de bajos pesos moleculares.

10 También dentro del marco del presente invento se ha puesto de manifiesto como conveniente añadir tales compuestos. No obstante, en tal caso debe procurarse que las sustancias utilizadas no influyan sobre el sistema de coagulación. Desde este punto de vista es ventajoso añadir, en calidad de sustancias estabilizadoras, carbohidratos neutros en una concentración hasta de 5% en peso a los plasmas que han de ser liofilizados. Son especialmente apropiadas, por ejemplo, sacarosa y lactosa, que pueden estar presentes en el plasma por sí solas o conjuntamente en 1-2%. Además de ello se ha puesto de manifiesto como ventajoso añadir al plasma sustancias tampón que sean capaces de ajustar el plasma líquido a un valor de pH entre aproximadamente 7,1 y 7,2, habiéndose de procurar en tal caso que se escojan sustancias tampón que no influyan en el presente plasma en la cantidad necesaria sobre el sistema de coagulación, no pasen a formar ningún tipo de complejos y posean valores de pK_a de aproximadamente 6 a 8,5. De los agentes tan

15

20

25

pón propuestos a este respecto por N. E. Good y otros, 1966 (Biochemistry 5, 467-477), que en sistemas bioquímicos manifiestan un comportamiento ampliamente indiferente, se ha manifestado como favorable emplear el agente tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N-etanosulfónico (Hepes) en una concentración hasta de 0,01 M. La dificultad en el caso de adiciones de agente tampón se establece entre otras razones también por el hecho de que la adición de agente tampón en forma sólida produce un desplazamiento local del valor del pH en el plasma con la consecuencia de que se perturba el sistema de coagulación, frente a lo cual la adición del agente tampón en forma disuelta provoca una inadmisibile dilución del plasma.

El plasma sanguíneo conservado bajo un gas protector conteniendo dióxido de carbono es utilizado a causa de su estabilidad como plasma comparativo en el caso de investigaciones de coagulación, especialmente para la determinación del índice de Quick, del tiempo de tromboplastina parcial, del tiempo de coagulación de plasmotrombina, de los factores de coagulación II, V, X, XIII y del fibrinógeno. Los métodos de determinación se llevan a cabo de acuerdo con los siguientes procedimientos:

1. Índice de Quick:

1 parte de una solución de citrato sódico de 0,1 M por litro y un valor de pH de 4,5-7 es mezclada cuidadosamente con 9 partes de sangre venosa de la persona sometida a experimentación, evitando la formación de espuma, y se centrifuga durante 10 minutos a aproximadamente 3.000 r.p.m. correspondientes a 1.500 x g. El plasma sobrenadante es decantado y conservado a 4°C hasta la realización del ensayo. A 0,1 ml del plasma previamente calentado a 37°C se añaden 0,2 ml de una solución de tromboplastina cálcica también calentada previamente a 37°C, y con ayuda de procedimientos conocidos para la determinación se observa el tiempo que transcurre hasta la aparición de la coagulación, por ejemplo de acuerdo con el método del ganchito, el método de la bola, el método de vuelco o con coagulómetros automáticos. El tiempo de coagulación encontrado es puesto en relación con ayuda de una curva patrón que ha de ser producida de antemano, utilizando el plasma sanguíneo conservado de acuerdo con el invento o un plasma sanguíneo recientemente obtenido. El valor patrón del índice de Quick se encuentra, en el caso de plasmas normalizados, que o bien se han obtenido recientemente o bien han sido conservados de acuerdo con el invento, en 12-16 segundos para plasma empleado en estado no diluido.

La determinación del índice de Quick es un ensayo de comprobación de estados defectuosos de los factores VII, X, V, II y I que participan en el sistema de coagulación exógeno.

5

2. Tiempo de tromboplastina parcial:

10

15

20

En el caso de la determinación del tiempo de tromboplastina parcial el plasma es obtenido del mismo modo que para la determinación del tiempo de Quick y se incuban partes-iguales (0,2 ml) del plasma y 0,2 ml de una suspensión de trombocitos humanos lavados con una adición de caolín, durante 2 minutos a 37°C. A 0,2 ml de la mezcla de incubación se agrega una solución 0,025 molar de cloruro de calcio y se determina el momento de la iniciación de la coagulación igual que en el modo descrito con ocasión del tiempo de Quick. El tiempo de tromboplastina parcial manifiesta valores normales entre 40 y 60 segundos. Tiempos de coagulación que exceden de 55 segundos proporcionan indicación de perturbaciones de la coagulación y exigen investigaciones detalladas especialmente acerca de los factores VIII y IX.

25

3.- Tiempo de coagulación de plasmatrombina.

Para la determinación del tiempo de coagulación de plasmatrombina se incubaba plasma con citrato, igual a como se describe con ocasión de la determinación del tiempo de Quick, con el mismo volumen de una solución que

5 contiene 6 unidades de trombina por ml, y se determina de modo habitual el tiempo de coagulación. Los valores normales para el tiempo de coagulación de plasmatrombina se encuentran entre 17 y 24 segundos. El tiempo de coagulación de plasmatrombina sirve sobre todo para la
10 vigilancia de una terapia con estreptoquinasa o con heparina. En el caso de una terapia con estreptoquinasa se registran en este sistema de ensayo tiempos de coagulación situados entre 34 y 96 segundos, mientras que una terapia con heparina prolonga el tiempo de coagulación desde 34 hasta 110 segundos.

4. Factores de coagulación II y V.

15 La determinación de los factores de coagulación II y V se puede efectuar por regla general de modo conjunto. Para ello, el plasma a ensayar es obtenido de igual modo que en el caso de la determinación del índice de Quick y el plasma es incubado con el mismo volumen (0,1 ml) de un plasma con déficit de factor II o de factor V. Igual que en el caso de la determinación del índice de
20 Quick se añaden a ambas mezclas en cada caso 0,2 ml de solución de tromboplastina cálcica, y seguidamente se determina el tiempo de coagulación de modo acostumbrado. El tiempo de coagulación medido es proporcional a las concentraciones de los factores de coagulación II y V. El contenido de los factores de coagulación es leído o
25

interpretado en una curva de referencia, que ha sido establecida con plasma normalizado recientemente obtenido o conservado de acuerdo con el invento. La determinación de la concentración del factor de coagulación II sirve para el cálculo detallado de estados de déficit de protrombina, mientras que la determinación del factor V está indicada en el caso en que haya sospechas de parahemofilia.

5. Factor de coagulación X:

La determinación del factor de coagulación X se efectúa igualmente con el plasma con citrato utilizado en el caso de la determinación del tiempo de Quick, que es incubado en una dilución de 1:20 con los mismos volúmenes (0,1 ml) de un plasma deficitario en factor X y de una solución de tromboplastina de veneno de serpiente durante 30 segundos a 37°C, después de ello se añaden 0,1 ml de una solución 0,025 molar de cloruro de calcio y se determina el tiempo de coagulación de modo acostumbrado. El tiempo de coagulación resultante es proporcional a la concentración de factor X del plasma que se ha de ensayar. El contenido de factor X es leído en una curva de referencia, que se había obtenido con ayuda de un plasma mixto recientemente obtenido de personas normales o de un plasma conservado de acuerdo con el invento.

6. Factor de coagulación XIII:

En el caso de la determinación del factor XIII se lleva a cabo la obtención del plasma con citrato en presencia de un inhibidor polivalente de proteínasa de 2,5 unidades antiplasmina por ml de sangre. Para la realización de la determinación se necesita un suero con antifactor XIII, que es incubado a la temperatura ambiente durante 30 minutos en una dilución en serie formulado junto con plasma. Después de ello, a cada mezcla de incubación se añade antisucro con plasma, trombina y cloruro cálcico, y de este modo el plasma es llevado a la coagulación. Para la total formación de coágulo, las formulaciones permanecen a la temperatura ambiente durante al rededor de 1 hora. Después de añadir una solución al 1% de ácido monocloroacético a cada mezcla de incubación se determina la dilución de plasma con la cual justamente se ha disuelto todavía el coágulo en el ácido monocloroacético. La cantidad del factor XIII en el plasma que ha de ser sometido a determinación es puesta en relación con la cantidad que resulta en plasmas normalizados en el caso de la determinación del factor XIII, los cuales plasmas pueden haber sido recientemente obtenidos o almacenados de acuerdo con el invento.

7.- Fibrinógeno:

La determinación del fibrinógeno se efectúa igualmen

5

10

te utilizando plasma con citrato que es llevado a coagulación con trombina. El coágulo que resulta en tal caso es obtenido en forma de sedimento por centrifugación a 45.000 rpm. La porción sobrenadante es separada por decantación, el sedimento es lavado varias veces con solución isotónica de sal común, y finalmente es secado en vacío. Por medio de una determinación del contenido de nitrógeno de acuerdo con Kjeldahl se calcula el contenido de proteínas del coágulo en mg, que es indicado como fibrinógeno. También en este caso, el contenido de fibrinógeno del plasma normalizado almacenado de acuerdo con el invento sirve como sistema de referencia.

El invento se va a explicar con mayor detalle con el siguiente ejemplo.

15

Ejemplo

20

25

En 50 ml de una solución tampón de citrato con un contenido de 0,1 l/l de citrato de sodio y con un valor de pH de 7,0, que es estéril y está libre de agentes de conservación, se hacen afluir cuidadosamente, evitando la formación de espuma, 450 ml de sangre venosa de un donante sano; y se mezclan con cuidado los dos componentes. La sangre con citrato es centrifugada durante 30 minutos a 8.000 g y el plasma es retirado por sifonamiento. El plasma es mezclado con plasma con citrato de otros 9 do

5 nantes, obtenido del mismo modo, de manera que resulta una reserva en total de 10 donantes de sangre sanos. A la mezcla de plasmas se añade lactosa y sacarosa en cada caso hasta una concentración final de 1%. Además, con una adición de 4 g de ácido N-2-hidroxiethylpiperazino-N-
10 -etanosulfónico (HEPES) por litro de plasma se ajusta a 7,1 el valor del pH del plasma. La mezcla de plasmas es envasada después de ello en porciones de 1,0 ml en recipientes con un contenido total de 6,5 ml y es congelada en el bloque. El plasma congelado es secado en una instalación de liofilización. A continuación se genera un vacío de 5×10^{-4} Torr. Los plasmas liofilizados permanecen durante 3 horas en este vacío. Después de ello se hace afluir en el espacio puesto en vacío dióxido de carbono gaseoso hasta la igualación a la presión atmosférica. Los recipientes son cerrados finalmente de modo estanco al aire.

15 Una comprobación de calidad de 5 muestras tomadas al azar indicó en promedio para el tiempo de Quick 12,0 segundos, para el tiempo de tromboplastina parcial 41,8 segundos, y para el tiempo de coagulación de plasmatrombina 19,4 segundos. Se ha puesto de manifiesto que estos valores apenas son alterados después de algunos meses de almacenamiento incluso a 37°C , y que en el caso de
20 un almacenamiento a 4°C durante más de 3 años sólo per-

miten esperar dos iaciones insignificantes. En vez de dióxido de carbono una mezcla de 50% de dióxido de carbono y 50% de nitrógeno (V:V) ó una mezcla de 5% de dióxido de carbono y 95% de nitrógeno pueden ser llenadas en el espacio vacío de aire; el nitrógeno por ejemplo puede ser reemplazado por una mezcla de un gas noble inerte y estable tal como helio, neón ó argón, con el dióxido de carbono.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el día 31 de Diciembre de 1974, bajo el Nº P 24 61 969.0, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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.- Procedimiento para la preparación de una plasma sanguíneo, caracterizado porque plasma sanguíneo liofilizado y eventualmente estabilizado es incorporado en un gas protector conteniendo por lo menos 5% de dióxido de carbono.

5

2ª.- Procedimiento para la preparación de plasma sanguíneo según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se añade sangre recientemente obtenida a una cantidad previamente dispuesta de un anticoagulante, la sangre se centrifuga, el plasma se obtiene, eventualmente se mezcla con sustancias estabilizadoras, se envasa en recipientes no humedecibles, se congela con formación de una gran superficie, se liofiliza, se pone en vacío, y finalmente se cierra bajo un gas protector conteniendo un dióxido de carbono.

10

3ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PLASMA SANGUINEO.

15

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

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

24 SET 1976

Madrid,

P.A.

Oscar de Elizaburu
Por Feder.

