

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

-5 ENE. 1979

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que constan en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES 471.857

11	NUMERO	471.857	10	A1
21	FECHA DE PRESENTACION	19-7-78		

471,857

PATENTE DE INVENCION

50	PRIORIDADES:	52	FECHA	59	PAIS
31	NUMERO	818.920	25-7-77		EE.UU.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A61K		

63 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO PARA SEPARAR UNA PREPARACION DE FACTOR IX A PARTIR DE PLASMA".

71 SOLICITANTE (S)

MONSANTO COMPANY (07-21-0782A SP)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63166, Estados Unidos de América.

72 INVENTOR (ES)

Jacques Jean Joseph Delente y Richard Alan Schoenfeld

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 69.474)

lfg

POOR QUALITY

1

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a la fraccionación de sangre y más particularmente a la separación de una preparación del factor IX de coagulación de la sangre, a partir de plasma, mediante la adsorción selectiva de los factores II, IX y X.

10

El procedimiento de coagulación de la sangre es una actividad fisiológica complicada que involucra la interacción de numerosas sustancias encontradas en la sangre entera normal. Se sabe que ciertos factores asociados con el mecanismo de coagulación de la sangre están ausentes o son seriamente deficientes en ciertos individuos. En aquellos pacientes que sufren de la clásica hemofilia, es deficiente el factor antihemofílico A (AHF, Factor VIII). En aquellos pacientes afligidos con hemofilia B, falta el componente de tromboplastina del plasma (PTC. Factor IX), de la sangre.

15

20

Otros varios factores que son importantes en el mecanismo de coagulación son los factores II, VII y X. Como con los factores VIII y IX, estos otros factores son también deficientes o están ausentes en ciertos individuos. Los factores II, VII y X están usualmente asociados con el factor IX en la fraccionación del plasma sanguíneo en diversas fracciones, y se ha llegado a conocer un concentrado de estos cuatro factores, como complejo de protrombina.

25

30

En el desarrollo de programas de formación de bancos de sangre modernos que involucran la recolección y almacenamiento de grandes cantidades de sangre y de componentes de la sangre, es crítico el establecimiento de sistemas

1 de conservación adecuados. Desde la Segunda Guerra mun--
dial ha sido práctica común recoger la sangre en una solu-
ción de ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa, cono-
cida como sangre ACD. El problema de conservar la sangre
5 es muy simplificado, sin embargo, cuando se reduce a la -
conservación de diversos componentes de la sangre, ya que
es más fácil de satisfacer los requerimientos ambientales
de los componentes separados que de la sangre entera.

10 Además, es un desperdicio y aún perjudicial para el
paciente administrar más componentes de la sangre que los
que requiera. Así, el hemofílico que necesita ciertos --
factores de coagulación de la sangre debe recibir ideal--
mente sólo los factores requeridos o por lo menos un con-
centrado purificado de estos factores que contenga un ni-
15 vel reducido de factores no necesarios.

La fraccionación de la sangre para obtener factores
VIII, IX de coagulación de la sangre y el complejo de pro-
trombina, es bien conocida. La mayor parte de los méto--
dos de fraccionación requieren la separación del factor -
20 VIII del plasma u otro material de partida antes de la se-
paración del factor IX o el complejo de protrombina. Por
ejemplo, el factor VIII es a menudo separado primeramente
del plasma como un crioprecipitado o mediante precipita--
ción con glicina o polietilenglicol como se describe en --
25 las patentes de EE.UU. 3.631.018 y 3.652.530 y referencias
citadas en las mismas.

Diversos métodos previos de fraccionación de la san-
gre para la preparación del complejo de protrombina inclu-
yen el método de adsorción por sulfato de bario descrito
30 por Powell en la patente de EE.UU. 2.999.791 y el método

1 de adsorción de fosfato tricálcico descrito por Soulier -
y otros, La Presse Medicale 72, 1223-28 (1964). Tullis -
describe el uso de cambiador de iones de DEAE-celulosa pa-
ra la producción de un complejo de protrombina, New England
5 Journal of Medicine 273, 667-74 (1965) mientras que se --
describe el uso correspondiente de DEAE-Sephadex en la pa-
tente de EE.UU. 3.717.708 de Wado y Mozen. Anderson y --
otros; en la patente de E.U.A. 3.920.625, describen además
el uso de DEAE-Sephadex específicamente para la prepara-
10 ción de concentrados del factor IX. El uso de polietilen
glicol para la producción del complejo de protrombina es
enseñado por Fekete y Shanbrom en las patentes de EE.UU.
3.560.475 y 3.682.881. El hidróxido de aluminio y otros
materiales de gel similares son también conocidos como --
15 útiles en la concentración de los factores del complejo --
de protrombina como se ve de la patente de EE.UU. - - -
2.867.567 de Bidwell.

Como se distingue de todos los métodos anteriores, --
en la presente invención se separa del plasma una prepara-
20 ción del factor IX, de manera que contenga también los --
factores II y X pero no el factor VII que está contenido
usualmente en los concentrados de complejo de protrombina
de la técnica anterior. Además, la preparación del fac-
tor IX de esta invención puede separarse ventajosamente --
25 del plasma antes de la separación del factor VIII.

Breve resumen de la Invención

De conformidad con la presente invención, se separa
del plasma líquido una preparación del factor IX que con-
tiene los factores II, IX y X, con un copolímero de etile
30 no y anhídrido maleico de polielectrolito reticulado inso

1 luble en agua que contiene grupos funcionales de dialcoholo inferior-aminoalcoholo inferior pendientes. Mediante
5 el uso del copolímero de polielectrolito a una concentración relativamente baja, de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,1% en peso del plasma y a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5, se adsorbe selectivamente una preparación del factor IX que contiene los factores II, IX y X, sorprendentemente, por el copolímero de polielectrolito con la exclusión substancial de los factores VII y VIII que no son adsorbidos y permanecen en el plasma líquido.

10 Si se desea, la preparación del factor IX adsorbido puede entonces eluirse del polielectrolito por lavado con una solución acuosa de una sal fisiológicamente aceptable, tal como NaCl, por ejemplo, una solución de aproximadamente uno a tres molar de NaCl. La elución se realiza preferiblemente a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, aunque pueden utilizarse también pH mayores.

Descripción detallada de la Invención

20 El plasma de partida utilizado en el método de fraccionación de esta invención se obtiene generalmente recién congelado. Este plasma debe ser descongelado antes de la fraccionación con el copolímero de polielectrolito, preferiblemente por calentamiento a una temperatura de por lo menos aproximadamente 35°C. El copolímero de polielectrolito apropiado puede ser después mezclado con el plasma a una concentración de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,1%, y preferiblemente de aproximadamente 0,035% a aproximadamente 0,05%, y el pH ajustarse a una escala de
25 aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. La mezcla se
30

1 agita durante un tiempo adecuado, por ejemplo, por lo me-
nos aproximadamente 10 minutos, tiempo durante el cual la
preparación del factor IX se adsorbe selectivamente por -
medio del copolímero de polielectrolito y el plasma líqui-
do restante se hace deficiente en los factores II, IX y -
5 X.

En general, los copolímeros de polielectrolito reti-
culados, insolubles en agua, empleados en esta invención,
son copolímeros de etileno y anhídrido maleico que contie-
nen grupos funcionales pendientes de dialcoholo inferior-
10 -aminoalcoholo inferior. Por el término "alcoholo infe-
rior" se quiere dar a entender un grupo alcoholo que tie-
ne de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 átomos de car-
bono.

15 El copolímero de base de etileno y anhídrido maleico
(EMA) puede prepararse, por ejemplo, haciendo reaccionar
etileno y anhídrido maleico en presencia de un cataliza-
dor de peróxido en un disolvente adecuado. El copolímero
contendrá preferiblemente cantidades substancialmente - -
20 equimolares del residuo de etileno y el residuo de anhi-
drido.

El copolímero de EMA de base puede hacerse reaccionar
con una alcoholo inferior-imino-bis-alcoholo inferior-ami-
na que tiene dos grupos de amina primarios y conduce a un
25 copolímero de EMA reticulado. Los grupos funcionales pen-
dientes de dialcoholo inferior-aminoalcoholo inferior de-
seados pueden después incorporarse en el copolímero reti-
culado mediante reacción de dialcoholo inferior-aminoal-
coholo inferior-amina con parte de los grupos anhídridos
30 restantes del polímero de EMA, o con todos los mismos. -

1 El copolímero de polielectrolito se convierte también de-
seablemente en la forma de sal de HCl para proporcionar -
mejores características de manejo. Pueden obtenerse deta-
lles adicionales sobre la preparación de estos copolíme-
5 ros de polielectrolito, haciendo referencia a la descrip-
ción de la patente de EE.UU. 3.554.985, que se incorpora
aquí como anterioridad. El uso de estos copolímeros de -
polielectrolito en la fraccionación de la sangre se des-
cribe en la patente de EE.UU. 3.555.001.

10 Un grupo funcional de dialcoholo inferior-aminoalcoholi-
lo inferior preferido es dimetilaminopropilo y un agente
de reticulación preferido es metil-imino-bis-propilamina.

15 Un copolímero de polielectrolito preferido para utili-
zarse en esta invención contiene aproximadamente cinco --
grupos de reticulación de metil-imino-bis-propilamina y -
aproximadamente noventa grupos funcionales de dimetilambi-
nopropilamina pendientes por cien unidades de anhídrido -
maleico en el copolímero de EMA.

20 Otros agentes de reticulación, por ejemplo, divinil-
benceno y etilendiamina, y otros grupos funcionales, por
ejemplo, dimetilaminoetilo y dietilaminobutilo, pueden --
también utilizarse en los copolímeros de polielectrolito
que se emplean en el método para separar la preparación -
del factor IX de la presente invención.

25 Después de la adsorción de la preparación de factor
IX, el factor VIII que queda en la solución del plasma --
puede concentrarse adicionalmente y recuperarse por técni-
cas conocidas. La preparación del factor IX adsorbida --
puede recuperarse convenientemente por elución a partir -
30 del copolímero de polielectrolito por lavado con una solu-

1 ción acuosa de NaCl que tiene una molaridad de aproximada-
mente 1 a aproximadamente 3.

5 En una realización preferida de la invención, se em-
plea aproximadamente 0,035% en peso del copolímero de po-
lielectrolito que contiene aproximadamente cinco grupos -
de reticulación de metil-imino-bis-propilamina y aproxima-
damente 90 grupos de dimetilaminopropilamina funcionales
por cien unidades de anhídrido maleico en el copolímero de
10 EMA, para la adsorción selectiva de la preparación del --
factor IX a un pH de aproximadamente 8. La preparación -
del factor IX adsorbida se eluye después del copolímero -
de polielectrolito por lavado con NaCl 1,7 molar a un pH
de 6. El eluyente puede después dializarse contra NaCl -
0,1 molar a 4° y secarse por congelación para almacenamien-
15 to.

Los ejemplos siguientes ilustrarán además la inven-
ción, aunque se apreciará que la invención no está limita-
da a estos ejemplos específicos.

EJEMPLO I

20 En este ejemplo, el copolímero de polielectrolito --
consta del producto de reacción de partes sustancialmente
equimolares de etileno y anhídrido maleico (EMA) reticula-
do con metil-imino-bis-propilamina (MIBPA) y hecho reaccio-
nar adicionalmente con dimetilaminopropilamina (DMAPA) de
25 manera que proporcione aproximadamente cinco grupos de re-
ticulación de MIBPA y aproximadamente 90 grupos pendientes
de DMAPA por cien unidades de anhídrido maleico en el copo-
límero de EMA, y se convierte en la forma de sal de HCl.
Un litro de plasma humano normal se agitó a un pH de 8 -
30 con NaOH 1 molar y se agregaron al mismo 0,35 g del copo-

1 límero de polielectrolito anteriormente mencionado, y la
mezcla se agitó durante 20 minutos. La mezcla se filtró
después y el filtrado se retuvo como un plasma con el fac
5 tor IX agotado. La torta del filtro se lavó con agua des
tilada para separar la proteína arrastrada.

Una preparación del factor IX que contiene los facto
res II, IX y X, se eluyó después del copolímero de poli--
electrolito por lavado con 25 mililitros de NaCl 1,7 mo--
lar a un pH de 6,0 (ajustándose el pH con ácido cítrico --
10 0,1 molar) durante 20 minutos. La suspensión de copolíme
ro se filtró después y el filtrado se retuvo como la pre
paración del factor IX deseada. En una serie de siete --
fraccionaciones duplicadas de un litro usando el procedi
miento anterior, se obtuvo un promedio de 483 ± 48 unida
15 des de factor IX por litro teniendo un índice de purifica
ción de 178 ± 33 . Una unidad del factor IX se define co
mo la cantidad de dicho factor en un mililitro de plasma
entero normal reunido. El índice de purificación se cal
cula como la relación de la cantidad de proteína total en
20 el plasma de partida a la cantidad de proteína total en --
la preparación del factor IX final multiplicada por la re
lación de las unidades del factor IX en la preparación --
del factor IX final a las unidades del factor IX en el --
plasma de partida.

25

EJEMPLO 2

Utilizando 0,4 mg/ml del copolímero de polielectro--
lito del Ejemplo 1 para mezclar con plasma humano normal
durante 20 minutos a un pH de 7,4, para separar una prepa
ración de factor IX como en el ejemplo 1, se midió la ad
30 sorción de los factores II, VII, VIII, IX y X, con los --

1 siguientes resultados:

Factor	Porcentaje Adsorbido [Ⓜ]
II	83
VII	0
VIII	5
IX	96
X	83

10

[Ⓜ] con base en la cantidad de plasma de partida.

15

Estos resultados muestran una alta selectividad de la adsorción de los factores II, IX y X con la exclusión substancial de los factores VII y VIII, con base en las cantidades correspondientes de estos factores en el plasma de partida.

20

Se utilizaron análisis convencionales de una etapa para determinar los factores de coagulación en los ejemplos anteriores. El sistema de análisis de una etapa para el factor VIII vendido comercialmente por Dade Division of American Hospital Supply Corporation se empleó en estos ejemplos. Este sistema de análisis está basado en el tiempo de tromboplastina parcial activada (PTT) usado para determinar deficiencias en los factores necesarios para el método intrínseco de formación de coágulo. La prueba PTT fue ideada por Brinkhous y colaboradores y notificada en J. Lab. Clin. Med. 41, 637 (1953). En estos análisis para los diversos factores de coagulación, la muestra problema se hizo reaccionar con un reactivo de tromboplastina parcial y se observaron el plasma de substrato

25

30

02088

1 deficiente en el factor apropiado que no contenía el fac-
tor a determinar, y el tiempo para la coagulación. El --
reactivo de tromboplastina parcial contiene cefalina cru-
da obtenida de cerebro de conejo que se sabe que coagula
5 el plasma normal más rápido que el plasma hemofílico. Ta
les reactivos son bien conocidos y se describen, por ejem
plo, en las patentes de EUA 3.395.210, 3.486.981 y - - -
3.522.148.

10 Otros diversos ejemplos serán evidentes para toda --
persona experta en la técnica después de leer la descrip-
ción de la presente invención, sin apartarse del espíritu
y alcance de la invención. Deberá entenderse que tales -
ejemplos están incluidos todos dentro del alcance de las
reivindicaciones anexas.

15

20

25

30

02088

REIVINDICACIONES

1

5

10

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:

15

1ª.- Un método para separar una preparación de factor IX a partir de plasma, caracterizado por poner en contacto plasma de sangre líquida a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5 con aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,1% en peso del plasma de un copolímero de etileno y anhídrido maleico, de polielectrolito reticulado y soluble en agua, que contiene grupos funcionales, pendientes de dialcoholo inferior-aminoalcoholo inferior, con lo cual se adsorben selectivamente los factores II, IX y X por medio del copolímero de polielectrolito con exclusión substancial de los factores VII y VIII que no son adsorbidos y permanecen en el plasma líquido.

20

25

2ª.- El método de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado porque el grupo funcional de dialcoholo inferior-aminoalcoholo inferior es dimetilaminopropilo.

30

3ª.- El método de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado porque el copolímero de etileno y anhídrido maleico se reticula con metil-imino-bis-propilamina.

02088

1 4ª.- El método de conformidad con la reivindicación
la, caracterizado porque el copolímero de polielectrolito
contiene aproximadamente cinco grupos de reticulación de
5 metil-imino-bis-propilamina y aproximadamente 90 grupos -
pendientes de dimetilaminopropilo por cien grupos de anhí-
drido maléico.

10 5ª.- El método de conformidad con la reivindicación
la, caracterizado porque la preparación del factor IX ad-
sorbida se eluye del copolímero de polielectrolito por la
vado con una solución acuosa de NaCl que tiene una molaridad
de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.

15 6ª.- El método de conformidad con la reivindicación
la, caracterizado porque la concentración del copolímero
de polielectrolito es de aproximadamente 0,035% a aproxima-
damente 0,05% en peso del plasma, y dicho copolímero de
polielectrolito contiene de aproximadamente cinco grupos
de reticulación de metil-imino-bis-propilamina y aproxima-
damente 90 grupos pendientes de dimetil-aminopropilo por
cien grupos de anhídrido maléico.

20 7ª.- "UN METODO PARA SEPARAR UNA PREPARACION DE FAC-
TOR IX A PARTIR DE PLASMA".

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


25

30

1 Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máqui-
na por una sola cara.

Madrid, 08.AGO.1978

P.A.

5

Fernando de Elzaburu
Por Poder

10

15

20

25

30

ARS/.

02088