



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

REVISION BIBLIOGRAFICA DE LOS METODOS DE
OBTENCION DEL FACTOR ANTIHEMOFILICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

FERNANDO GARCIA MENDOZA

Director : Q. F. B. Ramón Cendejas Ramírez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E G E N E R A L

	PAGINAS
PREFACIO	4
INTRODUCCION	6
CAPITULOS	
I. GENERALIDADES	9
A. HISTORIA	10
B. GENETICA	10
C. COAGULACION	10
D. EL PAPEL DEL FACTOR VIII EN LA COAGULACION.	12
E. SINONIMOS PARA EL FACTOR ANTIHEMOFILICO ...	13
F. LAS ALTERACIONES CONGENITAS DE LA COAGULA--	
CION Y EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.....	14
1. HISTORIA Y EXAMEN FISICO	14
2. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	14
G. BIOQUIMICA	15
1. SINTESIS DEL FACTOR VIII	15
2. COMPOSICION QUIMICA	15
3. ESTRUCTURA	15
4. ESTABILIDAD DEL FACTOR VIII	19
II. METODOS DE OBTENCION DEL FACTOR VIII (INTRODUC-	
CION)	21
A. METODO DE POOL J.B., 1975 (A-1)	23
B. METODO DE JOHNSON A.J. Y COLS., 1979 (A-2)...	26
C. METODO DE WENSLEY R.T. Y SNAPE T.J., 1980	
(A-3)	30
D. METODO DE MENTITOVE J.E. Y COLS., 1983 (A-4).	45
E. METODO DE BRINKHOUS K.M. Y COLS., 1968 (B-1).	51
F. METODO DE LEGAZ M.E. Y COLS., 1973 (B-2).....	65
G. METODO DE LOPACIUK S. Y COLS., 1975 (B-3)....	72
H. METODO DE WICKERHAUSER M., 1976 (B-4).....	77
I. METODO DE WICKERHAUSER M. Y COLS., 1978 (B-5)	90

J. METODO DE JOHNSON A.J. Y COLS.,1978 (D-6)...	108
K. METODO DE DANIEL T.H. Y COLS.,1980 (D-7)....	118
L. METODO DE HOROWITZ E. Y COLS.,1984 (B-8)....	129
DISCUSION GENERAL	136
A. OBJETIVOS	137
B. TECNICAS	140
C. RESULTADOS	144
D. ELECCION DE LA TECNICA	156
E. TRATAMIENTO	159
F. PRUEBAS DE COAGULACION	162
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFIA	166

P R E F A C I O

P R E F A C I O

Mediante el presente estudio bibliográfico se pretende reunir información, proveniente de diferentes autores, relacionada con los Métodos de Obtención del factor Antihemofílico humano (actividad coagulante) a partir de plasma como etapa inicial. Siendo el objetivo primario el presentar algunas de las Técnicas de Obtención de Crioprecipitados y Concentrados de Factor VIII.

Este trabajo está enfocado a la presentación de las Técnicas de Obtención de Crioprecipitados y Concentrados de Factor VIII, debido principalmente a que en la actualidad estas preparaciones son las que se usan más comunmente para el tratamiento de la Hemofilia A (Ver más adelante en Discusión General).

El motivo principal de éste trabajo está fundamentado en la situación de que, si bien por el momento, la Hemofilia A es un padecimiento que no afecta a un gran número de individuos, pero a medida que se aplican más ampliamente las técnicas de diagnóstico se observa que la incidencia en todos los países tiende a igualarse, un caso por cada 10,000 varones (O.H.S., Ginebra, 1982). Y es muy probable que este número aumentará principalmente por dos motivos. En primer lugar, el número de enfermos que fallecerán en su juventud disminuye hoy en día, por lo que habrá mayor cantidad de pacientes que alcanzan la edad adulta. En segundo término, es previsible que estos hemofílicos que lleguen a la edad adulta se casarán y tendrán hijas que serán portadoras de la enfermedad, las cuales a su vez, tendrán una proporción de descendencia masculina -- con la misma dolencia. Este aumento, obviamente, no será aparente hasta la segunda generación (Biggs R. en Rizza C.R., -- 1980).

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Durante el desarrollo de este trabajo, el cual tiene como principal objetivo el presentar 12 diferentes técnicas (4 -- para crioprecipitados y 8 para concentrados) para la obtención del factor antihemofílico humano (actividad coagulante) se tratarán los temas de una manera concreta y directa. En el caso que sea necesario profundizar en algún punto en particular se tomarán en cuenta las referencias anotadas por los autores y se obtendrá de su análisis notes, tablas o gráficas -- que expliquen lo que se requiera.

En el Capítulo Primero, se hablará sobre la Historia de la Hemofilia así como los aspectos Genéticos de la misma. Continuando con el Proceso de Coagulación Sanguínea, el Papel del Factor VIII en la Coagulación, Sinónimos para el Factor Antihemofílico, Alteraciones Congénitas de la Coagulación y su -- Diagnóstico en el Laboratorio, y para finalizar algunos aspectos Bioquímicos del Factor VIII.

En el Segundo Capítulo, se presenta primeramente una pequeña reseña histórica de las técnicas de obtención de preparaciones usadas para el tratamiento de la Hemofilia A. Y seguidamente, las Técnicas de Obtención de crioprecipitados y concentrados de factor VIII, describiendo el Objetivo de cada -- una, la Metodología seguida, los Reactivos y Materiales, los Resultados y sus Conclusiones. Cada técnica incluirá lo antes mencionado de una manera organizada y separada de las otras, -- de esta manera cada una será tratada independientemente de -- las demás, permitiendo así su rápida y fácil consulta, respetando en todo momento la originalidad de cada técnica.

En la Discusión General, se presentan de una manera resumida los Objetivos de cada técnica, los pesos principales para la obtención del producto o los cambios más importantes llevados a cabo sobre las técnicas estándares, los Resultados más -- relevantes se presentan en el Cuadro No. I poniendo mayor --

énfasis en las etapas claves o comentarios. Continuando con la metodología seguida para la elección de la Técnica más apropiada a cada interés en particular. Después del tratamiento, las Pruebas de Coagulación usadas y finalmente las Conclusiones a este trabajo.

La Bibliografía se presenta en orden alfabético por autor. Y es el resultado de la consulta de las siguientes fuentes:

MEDLARS ON LINE (INDEX-MEDICUS)	1973-1984
BIOSIS PREVIEWS (BIOLOGICAL ABSTRACTS)	1969-1984
EMBASE (EXCERPTA MEDICA)	1975-1984
CASEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS)	1982-1984

Además de la información proporcionada por la División - HYLAND de los Laboratorios TRAVENOL, durante el tiempo que laboré en el primero (1980 - 1982).

C A P I T U L O I
G E N E R A L I D A D E S

GENERALIDADES

A. HISTORIA

La historia de la hemofilia es probablemente tan antigua como la del mundo, pero la difusión de su conocimiento se debe en gran parte a los descendientes de la reina Victoria (Jones P., 1978; Ingram G.I.C., 1976).

Hace un poco más de 30 años la mayoría de los hemofílicos morían de hemorragia después de una operación. Hoy pueden esperar una vida de duración normal. Dos importantes acontecimientos han permitido tan notable cambio: El primero es el resultado del profesor McFarlane y sus colegas en Oxford, al descubrir que en la hemofilia A una proteína (factor VIII), era deficiente o no existía en absoluto y que podía ser reemplazada con sangre fresca o plasma. El segundo acontecimiento fue la organización, poco después de la segunda guerra mundial, de los servicios de transfusión de sangre (Jones P., 1976).

B. GENÉTICA

La hemofilia A es una enfermedad caracterizada por una baja concentración del factor VIII en el plasma. Se hereda por un rasgo recesivo ligado al sexo (Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978; Kasper C.K., 1974). No obstante, del 30 al 50% de los hemofílicos carecen de antecedentes familiares de esta enfermedad y se supone que estos casos se deben a una mutación espontánea. La incidencia notificada de la hemofilia A varía de un país a otro aunque a medida que se aplican más ampliamente las técnicas de diagnóstico se observa que la incidencia tiende a igualarse en todos los países. Se cree que la incidencia real es de uno por cada 10,000 varones (O.F.S., Ginebra, 1982).

C. COAGULACION

La importancia de la coagulación sanguínea ha sido reconoci

de desde los tiempos más remotos. En los antiguos escritos -- hebreos ya se describe la hemofilia como un estado patológico, y las leyes de aquel tiempo establecían que si el primogénito moría a causa de una hemorragia provocada por la circuncisión, los hijos siguientes quedaban dispensados de esa ceremonia. -- Del mismo modo, las antiguas leyes familiares de Egipto prohibían que una mujer tuviera más hijos si su primogénito moría -- a consecuencia de una hemorragia causada por una herida leve. (Manual Hyland Sobre Pruebas de Coagulación).

El sistema de coagulación mostrado en la figura No. 1 es -- una representación en cascada, forma que ha sido utilizada por otros autores anteriormente (Leavell B.S. y Thorup D.S., 1973; Davis E.W. y Fujikawa K., 1975; Wintrobe y cols., 1974; Jackson C.M., 1980), con sus modificaciones, pero que fue inicialmente adaptado por Davis y Ratnoff en 1964.

Como se muestra en la figura No. I, el sistema de coagula-- ción sanguíneo puede ser visualizado como una cascada de reac-- ciones distintas en las cuales una proteína precursora es con-- vertida de su forma inactiva en circulación a su forma activa. Tradicionalmente el sistema de coagulación ha sido dividido en dos caminos: el camino intrínseco, el cual involucra componen-- tes normalmente presentes en la circulación y el camino extrín-- seco, el cual involucra un factor tisular en adición a los com-- ponentes sanguíneos. La propagación del proceso de coagulación ocurre a lo largo de la trayectoria mostrada por las flechas-- negras eslabonando las elipses las cuales rodean el nombre del factor de coagulación. Las líneas punteadas son circuitos de -- retroalimentación o, el caso de la acción del factor XIIIa so-- bre el VII, y el factor VII (VIIa) sobre el IX, los factores -- cruzados por líneas parecen unir los caminos intrínseco y ex-- trínseco. Las reacciones de retroalimentación provocan la ace-- leración de los procesos de coagulación como un resultado de -- la activación de las dos proteínas cofactores, V y VIII (en e-- ste caso por la trombina) o VII y IX por Xa y VII o VIIa respec

tivamente. Los procesos de activación cíclicos al principio del camino intrínseco han sido referidos como una activación-recíproca. Excepto para la conversión de fibrinógeno a fibrina y en las etapas en las cuales los factores XII y XI son activados, todas las reacciones se piensa que ocurren sobre superficies de fosfolípidos (Jackson C.M., 1980).

D. EL PAPEL DEL FACTOR VIII EN LA COAGULACION

Chavin S.I., 1984 menciona en su artículo:

a) La mayoría de las proteínas plasmáticas las cuales participan en la coagulación son proteasas serínicas. Las dos mayores excepciones son el factor V y VIII, que parecen carecer de actividad enzimática y consecuentemente se piensa que son cofactores no catalíticos cuyas precisas funciones permanecen desconocidas.

b) Usterud y Rapaport, usaron antisuero el cual específicamente inhibió el factor VIII o factor IX, mostrando que los factores VIII y IXa necesitan estar presentes simultáneamente para obtener la máxima reducción del tiempo de coagulación. Ellos concluyeron que los factores IXa y VIII forman un complejo bimolecular, ambos componentes necesitan estar presentes y activos simultáneamente para lograr la óptima actividad del factor X. En la formulación original de la coagulación en cascada, el factor VIII fue pensado ser el sustrato para el factor IXa. Lundblad y Davis, mostraron que "el factor IX activo en una enzima la cual reacciona con el factor VIII convirtiendo al segundo en un producto activado el cual acelera la coagulación". Altas concentraciones del factor IXa pueden verdaderamente activar el factor VIII, pero la importancia de este camino no es todavía conocido.

c) El tratamiento de plasma con bajas concentraciones de trombina causa potenciación en la actividad del factor VIII y una disminución en el tamaño de la molécula.

d) Aunque las evidencias muestran claramente que la trombi-

na puede activar el factor VIII, no se sabe si éste es el único, o el más importante activador. Por analogía con el complejo protrombinasa y el factor V, el factor Xa sería el mayor activador del factor VIII. Experimentos posteriores han mostrado que el factor Xa es capaz de activar el factor VIII en presencia de calcio y fosfolípidos. No se sabe a ciencia cierta cual de los activadores del factor VIII son fisiológicamente más importantes para la expresión y regulación de la actividad coagulante.

e) Aunque la trombina puede causar un rompimiento proteolítico limitado y puede alterar la actividad coagulante del factor VIII, no se sabe si el factor VIII el cual no tiene o no ha sufrido ninguna modificación proteolítica tiene actividad coagulante, o si la proteólisis únicamente incrementa una actividad ya presente en la proteína sin modificación (Jackson C. M., 1980; Switzer M.E.P. y cols., 1979). Experimentos posteriores han mostrado que el factor VIII presenta su máxima actividad coagulante seguidamente de la activación por trombina u otras proteasas serínicas.

f) Los distintos mecanismos de retroalimentación por los cuales la actividad del factor VIII puede ser modulada, se muestra a continuación, Figura No. II.

E. SINÓNIMOS PARA EL FACTOR ANTIHEMOFILICO

- Factor Antihemofílico (AHF) (Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978; Wintrobe M.M. y cols., 1974; Chevin S.I., 1984).
- Factor Antihemofílico A (Jackson C.M., 1980; Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978).
- Factor VIII (Jackson C.M., 1980; Chevin S.I., 1984).
- Globulina Antihemofílica (AHG) (Jackson C.M., 1980; Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978; Wintrobe M.M. y cols. 1974).
- Cofactor Plaquetario I (Jackson C.M., 1980; Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978; Wintrobe M.M. y cols., 1974).
- Tromboelastinógeno A (Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978).

- Tromboplastinógeno (Wintrobe M.M. y cols., 1974).
- F. VIII (Brinkhous K.M., 1982).

F. LAS ALTERACIONES CONGENITAS DE LA COAGULACION Y EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

1. Historia y Examen Físico

La forma de presentación más común es la de un paciente con historia personal o familiar de diátesis hemorrágica en el pasado. Las hemorragias espontáneas en el tejido celular subcutáneo, en los músculos o en las articulaciones, la hemorragia -- por varios puntos a la vez, la hemorragia prolongada tras un trauma o una operación que con frecuencia se presenta al cabo de unas horas y no cede con medidas locales son los síntomas -- más comunes. En Estas situaciones hay que realizar una historia personal y familiar cuidadosa (Lowe G. y Forbes C., en Rizza C.R., 1980).

2. Diagnóstico de Laboratorio

La conducta clínica óptima ante un paciente con una alteración de la coagulación de tipo congénito exige definir el tipo de anomalía, la valoración de la intensidad de ésta y la búsqueda de posibles inhibidores de la coagulación. Más del 95% de éstos pacientes tienen una alteración del factor VIII (hemofilia A o enfermedad de Von Willbrand), o del factor IX (hemofilia B). Las deficiencias de los demás factores de la coagulación son raras, pero en algún caso es necesario efectuar pruebas específicas en el laboratorio para descartar su existencia. La historia en el paciente, o en la familia, de una diátesis hemorrágica, ya sea espontánea o posterior a traumatismos, puede sugerirnos el diagnóstico, pero el reconocimiento de una deficiencia siempre requiere la práctica de técnicas de laboratorio de carácter general, primero, y luego de determinaciones -- más concretas por métodos de coagulación y ensayos inmunológicos (Lowe G. y Forbes C., en Rizza C.R., 1980).

Desgraciadamente, no existe una prueba única que sirva para identificar todos los posibles trastornos de la coagulación. -

Es necesario confeccionar un grupo de determinaciones que puedan demostrar la normalidad de las diferentes partes del sistema de la coagulación sanguínea (Lowe G. y Forbes C. en Rizza C.R., 1980). Para tales propósitos se puede consultar el cuadro presentado por Leavell B.S. y Thorup C.A. en su libro titulado "Hematología Clínica" en el capítulo de "Hemostasia: Teoría y Aplicaciones Clínicas".

G. BIOQUÍMICA

1. Síntesis del factor VIII

El lugar de síntesis del factor VIII continúe siendo en la actualidad un enigma, pese a las numerosas investigaciones que se han realizado tratando de aclarar su sitio exacto de producción. Los resultados obtenidos de los diversos estudios han llevado a pensar que dicho factor es producido por algún tejido que esté diseminado en todo el organismo, y en este sentido se ha implicado al sistema retículo endotelial (SRE), al tejido linfóide y al endotelio vascular (Rocha E. y cols., 1978; Hershgold E.J., 1974; Bloom A.L., en Rizza C.R., 1980).

2. Composición Química

Existen datos suficientes para asegurar que el factor VIII es un compuesto proteico, concretamente una glucoproteína, como lo demuestra el hecho de su precipitación con concanavalina que es un agente precipitante de las mismas (Rocha E. y cols., 1978).

El primer análisis químico realizado es el de Hershgold y cols., que describen a la globulina antihemofílica como un compuesto proteico con un contenido aproximado de un 75% de aminoácidos, 11% de carbohidratos y 11% de lípidos, de los cuales aproximadamente la mitad son fosfolípidos y el resto lípidos neutros (Rocha E. y cols., 1978).

3. Estructura

E. Rocha y cols., en 1978, encontraron que el factor VIII se disociaba en una fracción de bajo peso molecular, que conservaba

ba la actividad coagulante, y otra de alto peso molecular, -- que era portadora de las actividades del antígeno relacionado al factor VIII ($VIII_{AHG}$) y del factor de Von Willebrand ---- ($VIII_{VWF}$). Por otro lado, Thomas K.B. y cols. en 1983, encontraron que el factor VIII consiste de al menos dos distintas moléculas, factor VIII con actividad coagulante y factor de Von Willebrand. La fracción de alto peso molecular ha sido denominada proteína transportadora, componente pesado o subunidad HMW, mientras que la fracción de bajo peso molecular se conoce con los nombres de fragmento pequeño activo, componente de bajo peso molecular o subunidad LMW.

Las actividades que se consideran relacionadas con el complejo molecular del factor VIII son, (Rocha E. y cols., 1978; Gorman JJ, 1978; Austen D.E.G., en Rizza C.R., 1980).

- 1.- Actividad procoagulante del factor VIII ($VIII_c$), demostrable por pruebas biológicas de coagulación y de neutralización de anticuerpos homólogos y con capacidad para corregir las anomalías de coagulación del plasma hemofílico.
- 2.- Antígeno relacionado al factor VIII ($VIII_{AGN}$), evidenciable por pruebas de precipitación con anticuerpos heterólogos de conejo.
- 3.- Actividad de Von Willebrand ($VIII_{VWF}$), encargada de corregir los defectos de función plaquetar presentes en la enfermedad de Von Willebrand.

Hay grandes controversias acerca de las relaciones que guardan estas tres entidades entre sí. Algunos autores consideran que son tres aspectos funcionales de una misma molécula, mientras otros creen que se trata de tres moléculas distintas (Austen D.E.G., en Rizza C.R., 1980) y para los restantes se trataría de un complejo molecular (Rocha E. y cols., 1978).

Estas sustancias relacionadas no siempre se presentan juntas in vivo. La sangre de los hemofílicos carece de material activo coagulante, pero dispone de los otros dos. Además, la-

No hay acuerdo general sobre el tamaño de la molécula de factor VIII nativa. El factor humano purificado a una actividad específica de 350,000 veces mayor que su actividad en el plasma, migró como una banda simple de P.M. 100,000 en duodecil sulfato de sodio al 6% sobre gel de poliacrilamida. El peso molecular de la proteína sin reducir y sin desnaturar es de aproximadamente 230,000 (dos cadenas polipeptídicas de 100,000). El factor VIII purificado aproximadamente 164,000 veces por un procedimiento diferente, contenía polipéptidos mayores de 79,000 y 80,000 de peso molecular, más 6 adicionales bandas de alto peso molecular. Otro procedimiento, ha encontrado que el factor VIII consiste en una banda predominante de P.M. 365,000. Cuando el factor VIII parcialmente purificado fue separado de la proteína de Von Willebrand, usando disoluciones de calcio, el factor sin desnaturar tiene un P.M. de 285,000. No es sabido si esta multiplicidad de cadenas polipeptídicas es el resultado de degradación parcial de un simple polipéptido de alto peso molecular o si el factor VIII actualmente consiste en más de un tipo de polipéptidos, cada una de las proteínas han mostrado poseer varias de las conocidas propiedades del factor VIII. Así, sin embargo si algunas de estas proteínas han sufrido parcial degradación durante la purificación, al menos algunos de sus polipéptidos constituyentes retienen algunas de las funciones de la molécula sin degradar (Chavin S.I., 1984).

Grupos sulfidril y enlaces disulfuro en el factor VIII: -- Los agentes los cuales reaccionan con grupos sulfidril libres (ejem: iodoacetato o ácido sulfónico p-cloromercuri-benceno) tienen pequeño o ningún efecto sobre la actividad del factor VIII, esto sugiere que los grupos sulfidril libres no son requeridos para la actividad del factor VIII. La reducción de algunos enlaces disulfuro con baja concentración de ditiotretol, seguida por alcuilación, tampoco afectó la actividad del factor VIII. Cuando altas concentraciones de agentes reducto-

res fueron usadas 1.3, 2.5 y 3.9 mM seguida por alquilación, los niveles de factor VIII fueron reducidos por 14%, 48% y -- 73% respectivamente, y el peso molecular del factor VIII activo fue disminuido. Estos resultados sugieren la presencia de enlaces disulfuro con diferente susceptibilidad a la reducción, y la contribución de estos enlaces a la estructura y -- función del factor VIII (Chavin S.I., 1984).

4. Estabilidad del Factor VIII

Es importante tener presente a la hora del estudio del factor VIII la inestabilidad de su molécula, tanto en plasma como en preparaciones purificadas. El grado de estabilidad de la molécula dependerá en gran medida de la temperatura de almacenamiento, del grado de purificación, de las concentraciones de sal, del pH y del tipo de anticoagulante. En el caso del plasma fresco, el factor VIII parece conservar una mayor estabilidad en medio citratado, a pH entre 6.1 y 6.5 y congelando de una manera rápida. Se puede disminuir, en cierta medida, su labilidad en presencia de dextrosa, glicerol al 5% (Roche E. y cols., 1978), ácido epsilon aminocaproico, glicina, cisteína, gelatina, cloruro magnésico, cloruro de magnesio, cloruro cálcico, fructosa, ácido ascórbico y lisina (Augten D. E.G., en Rizza C.R., 1980).

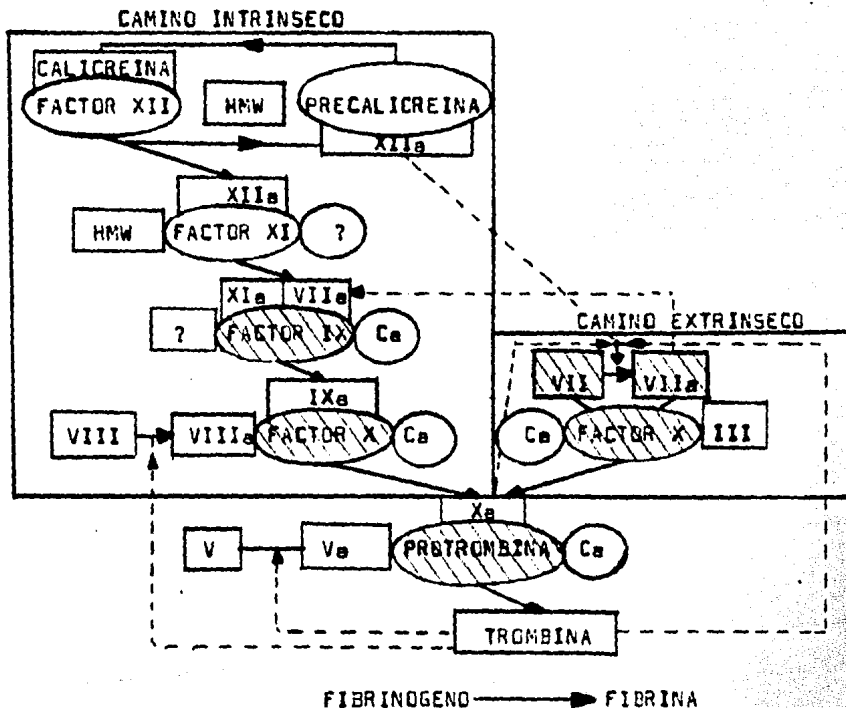


FIGURA No. I.-Representación en cascada del sistema de coagulación sanguíneo (Jackson C.M.,1980).



FIGURA No.II.-Mecanismos de retroalimentación por los cuales la actividad del factor VIII puede ser modulada (Chavin S.I., 1984).

C A P I T U L O I I .

M E T O D O S D E O B T E N C I O N D E L
F A C T O R V I I I

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL
FACTOR VIII

Los materiales terapéuticos que se han utilizado para aportar los factores de coagulación a los hemofílicos fueron, en primer lugar, la sangre total y el plasma y posteriormente, las fracciones plasmáticas que contienen al factor VIII en alta concentración y con escasa cantidad de proteínas contaminantes. Desde los trabajos de Wexle (1947) se conoce que cuando el plasma congelado se deja descongelar lentamente a baja temperatura, entre 0°C y 8°C, permanece sin disolver una pequeña cantidad de precipitado, la cual contiene aproximadamente un 3 % de las proteínas plasmáticas, formando parte fundamental de ellas el fibrinógeno. Brinkhous (1954) señaló que estas crioglobulinas contenían una cierta cantidad de factor VIII. Pool y Robinson (1959) comprueban que la cantidad de factor VIII presente en esta fracción, que denominaron crioprecipitado, era suficiente para permitir el tratamiento de la hemofilia A. Pool y Shannon (1965) descubrieron el método que permitía obtener esta fracción semipurificada del factor VIII. La aparición del crioprecipitado y más tarde los concentrados, revolucionaron el tratamiento de la hemofilia A, al permitir tratar con éxito los accidentes hemorrágicos y la práctica de cirugía con un alto margen de seguridad (Marqués G.F. y cols., 1981).

A continuación presento 4 técnicas para la obtención de crioprecipitados, los cuales están marcados del A-1 al A-4, el primero de 1975 y el último de 1983. De la misma manera, 8 técnicas para la obtención de concentrados de factor antihemofílico, marcados del B-1 al B-8, el primero de 1968 y el último con fecha de 1984.

Por lo que respecta a las técnicas, la bibliografía más antigua revisada es la de Cohn E.J. y cols., 1950.

A - 1

CRIOPRECIPITADOS : SU PREPARACION Y USO CLINICO

POOL J.G. (1975)

CRIOPRECIPITADOS: SU PREPARACION Y USO CLINICO

1.-INTRODUCCION

A continuación se presenta un método de obtención de crioprecipitados a partir de donaciones simples de sangre, los cuales se obtienen con una buena recuperación y pureza. Permitiendo de esta manera que el producto sea efectivo clínicamente para combatir la deficiencia que se tiene de el factor VIII en la Hemofilia A.

2.-MATERIALES Y METODO

La donación de sangre es recolectada en ACD o CPD como anticoagulante, teniendo precaución de mezclar continuamente la sangre y el anticoagulante. Esta última precaución es necesaria porque cualquier coágulo oculto se puede formar y disminuir el rendimiento del factor VIII. Inmediatamente después de la recolección, la unidad de sangre es centrifugada para separar las células del plasma y el plasma sobrenadante es exprimido dentro de la primera bolsa satélite. Esta bolsa, protegida por otra de polietileno, es rápidamente congelada en una mezcla de etanol y hielo seco. Durante este proceso de congelamiento, la bolsa primaria puede permanecer junta, con una abrazadera puesta entre las dos bolsas, o si el paquete celular es considerado como un producto, las dos bolsas pueden ser selladas y separadas antes del proceso de congelamiento. Si las bolsas permanecen juntas, son puestas en un refrigerador a 4°C para que se descongelen en frío, lo que requiere de 18 a 24 horas. Cercano al fin del tiempo, preferentemente cuando pequeñas cantidades de hielo aún permanecen, las bolsas son puestas en la centrifuga para separar el crioprecipitado. La bolsa de plasma es entonces colgada en una posición invertida, la abrazadera temporal es removida, y el plasma sobrenadante es rápidamente regresado a la bolsa primaria de la cual fue tomado. Se sellan los tubos y se mantienen separadas las bolsas de los crioprecipitados, los cuales pueden ser aplanados (éstos contienen aproximadamente 3 ml. de pasta) y almacenadas en un congelador a -20°C o menos. Si la bolsa primaria ha sido separada antes de la primera etapa de congelamiento, entonces el sobrenadante debe ser vaciado dentro de la segunda bolsa satélite, con esto se producen 3 productos finales, paquete de células rojas, crioprecipitado y plasma sobrenadante. Este último producto puede ser usado más tarde para la terapia de otros factores de la coagulación y puede ser fraccionado para obtener el complejo de protrombina, gamma globulinas y albúmina.

3.-RESULTADOS

El crioprecipitado contiene aproximadamente el 50 % del factor VIII el cual estaba presente en el plasma fresco congelado. El sobrenadante contiene de 15 al 20 % de la actividad original, el porcentaje faltante aparentemente se desnaturaliza durante las etapas de congelamiento y descongelamiento. El crioprecipitado también contiene un tercio del fibrinógeno plasmático, presumiblemente aquella parte más insoluble en frío. El contenido de otros factores de coagulación es insignificante, hay también pequeñas cantidades de albúmina y gamma globulinas, probablemente como un resultado del plasma ocluido en el crioprecipitado. No hay evidencias de la presencia de isoaglutininas.

Usando técnicas estériles, de 10 a 20 ml. de solución salina estéril es inyectada dentro de cada bolsa de crioprecipitado (125 más menos 59 U/bolsa de Factor VIII), después el crioprecipitado es descongelado en un baño de agua a 37°C. Esta solución debe ser inyectada dentro de las 2 horas siguientes a su preparación, como una precaución contra la posible contaminación bacteriana.

Este producto resultó ser apropiado para uso clínico e incluso para ser administrado bajo un programa de terapia en casa.

4.-DISCUSION

Mediante los pasos seguidos en este método, se obtiene un producto con una recuperación de aproximadamente el 50 %, al cual es apropiado para uso clínico.

A - 2

MEJORADO PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y FACTOR
VON WILLEBRAND POR CRIOPRECIPITACION CON POLIETILEN GLICOL.

JOHNSON AJ;MACDONALD VE;BRIND J. (1979)

MEJORADO PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y FACTOR VON WILLEBRAND POR CRIOPRECIPITACION CON POLIETILEN GLICOL

1.-INTRODUCCION

La crioprecipitación ha sido un método efectivo y práctico para el aislamiento y purificación parcial de AHF y vWF. Estos factores han sido aislados de unidades simples de plasma en los Bancos de Sangre, y el procedimiento ha sido usado para preparar concentrados comerciales de AHF a gran escala (Brinkhous, K M, y cols., 1968, Método B-1; Newman J, y cols., 1971 Figura No.27).

Los factores que influyen en el rendimiento de los crioprecipitados de plasma en los Bancos de Sangre han sido determinados en numerosos estudios: Después de la recolección de la sangre, los glóbulos rojos deben ser separados y el plasma obtenido refrigerado dentro de las 6 horas siguientes, la temperatura de centrifugación y otras muchas variables (aprox. 90) influyen también en el rendimiento final (Pool JG, 1975). La sangre debe ser almacenada a 4°C durante el periodo previo a su centrifugación, el plasma obtenido será también refrigerado a -70°C , el plasma así obtenido puede ser almacenado a -20°C antes de ser descongelado entre 0 y 4°C en un refrigerador (por 18 - 24 horas) o en baño de agua (por 40 - 45 minutos), el crioprecipitado será separado inmediatamente después del descongelamiento por centrifugación por 8 minutos a $5000 \times g$ a una temperatura de 2°C y el crioprecipitado resultante puede ser almacenado a -20°C hasta su uso (Burke ER, y cols., 1975).

El aislamiento del AHF a gran escala se considera ser más difícil, resultando un máximo de rendimiento del 30%. Los autores presentan un método con el que se obtiene un mayor rendimiento de AHF y vWF durante la crioprecipitación por adición de PEG - 4000 al plasma inicial a una concentración final de 1% (w/v).

2.-MATERIALES Y METODO

Plasma fresco, congelado dentro de las 4 horas siguientes a la recolección de la sangre, fue descongelado rápidamente a 37°C y reunido; se adicionó PEG a una concentración final de 1% (w/v) y el pH se ajustó a 7.5. El plasma con PEG fue mezclado por 10 a 20 minutos para solubilizar el PEG, el plasma fue transferido a bolsas de la siguiente manera: en una --

bolsa de 300 ml. se adicionaron 100 ml. del plasma, en una de 1000 ml. - 700 ml. del plasma y en otra de 2000 ml. - 1400 ml. de plasma. El plasma fue rápidamente congelado en hielo seco - etanol y almacenado hasta su uso a -70°C . Plasmas control de la misma muestra pool sin adición de PEG fueron congelados y crioprecipitados bajo condiciones idénticas a las muestras de plasma con PEG.

En experimentos para determinar el efecto de la temperatura sobre la crioprecipitabilidad, bolsas de plasma selladas de 100 ml. con y sin adición de PEG fueron puestos en baños de agua fría y etanol a diferentes temperaturas desde 2 a 10°C . Las muestras fueron examinadas periódicamente y fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, a la misma temperatura que el baño, tan pronto como todo el hielo se había fundido; la temperatura de las muestras fue usualmente mantenida entre 2 y 4°C . Los precipitados fueron drenados y reconstituidos en un décimo de volumen del plasma inicial en citrato 0.02 M , solución salina 0.12 M a pH 7.2 .

Cuando grandes volúmenes de plasma fueron crioprecipitados (1000-5000 ml.), el plasma de las bolsas fue molido, la mezcla pastosa de hielo fue puesta en una tina de acero inoxidable abierta, mantenida en un cuarto frío y se le sopló aire filtrado.

En 60 experimentos (Tabla No. 1) se observa que la adición de 1% de PEG aumentó el rendimiento de AHF aproximadamente al doble de otros métodos a gran volumen, y el método fue altamente reproducible no obstante el incremento en tamaño de 50 veces del plasma inicial (100 - 5000 ml. por lote). Este ganancia no se afectó por cambios moderados en la temperatura (Tabla No. 2) o pH (Tabla No. 3).

3.-RESULTADOS

La actividad específica del AHF preparado por adición de PEG a una concentración final de 1% fue de 0.38 más menos 0.05 U/mg de proteína o 25 veces purificado con respecto al plasma. Los controles sin adición de PEG dieron 0.35 más menos 0.08 U/mg de proteína o 25 veces purificado.

4.-DISCUSION

Este método parece ser útil para el aislamiento del concentrado de AHF a pequeña como a gran escala. La presente técnica de precipitación con PEG podría ser especialmente usada para la preparación de concentrados para tratar pacientes con enfermedad de von Willebrand así como también la Hg mofilia A.

Tabla No. 1.- Rendimiento de AHF preparado por crioprecipitación, con y - sin 1 % de PEG, de varias cantidades de plasma (descongelado a 4°C y ajustado el pH a 7.5).

VOLUMEN DEL PLASMA INI- CIAL (ml.)	% DE RENDIMIENTO DE AHF	
	CON PEG	SIN PEG
100	51	31
1000	58	-
5000	78	-

Tabla No.2.- Efectos de la temperatura sobre el rendimiento de AHF de crioprecipitados preparados con y sin 1 % de PEG.

TEMPERATURA °C	% DE RENDIMIENTO	
	CON PEG	SIN PEG
2	49	36
4	45	32
8	47	22
10	44	25
12	37	17

Tabla No.3.- Efectos de pH sobre el % de AHF recuperado en crioprecipitados de plasma con y sin 1 % de PEG.

pH	% PROMEDIO	
	CON PEG	SIN PEG
6.0	22	13
6.5	46	30
7.0	62	50
7.5	73	30
8.0	70	17
8.5	46	36

A - 3

PREPARACION DE UN MEJORADO CRIOPRECIPITADO CONCENTRADO DE FACTOR VIII
UN ESTUDIO DEL CONTROL DE TRES VARIABLES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO
R.T. WENGLEY Y T.J. SNAPE (1980)

PREPARACION DE UN MEJORADO CRIOPRECIPITADO CONCENTRADO DE FACTORVIIIUN ESTUDIO CONTROLADO DE 3 VARIABLES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO1. RESUMEN

El efecto sobre la recuperación del crioprecipitado de factor VIII - de 3 importantes variables ha sido investigado. Un objetivo del estudio fue eliminar, para el propósito de comparaciones internas, efectos tales como aquellos debidos a variaciones en los niveles de factor VIII en el plasma donado.

La elección del anticoagulante mostró tener significancia particular, el plasma recolectado en CPD de mayor rendimiento del crioprecipitado - de factor VIII.

El plasma muy fresco (el separado y congelado entre las dos horas siguientes a su recolección) da excelente recuperación de factor VIII, pero no fue detectada diferencia entre el crioprecipitado recuperado de plasma separado y congelado entre 4 y 18 horas después de la recolección de la sangre.

El descongelamiento rápido del plasma también mostró ser de utilidad, al menos para la recuperación del crioprecipitado a partir de plasma tratado con CPD.

2. INTRODUCCION

El crioprecipitado de factor VIII sigue siendo usado en el tratamiento de la hemofilia clásica y la crioprecipitación es usualmente la primera etapa del proceso en la producción de un concentrado de factor antihemofílico altamente purificado.

El conocimiento de las condiciones que gobiernan el rendimiento de la actividad del factor VIII, en el crío, es incompleto. Una investigación hecha por Guson y cols., 1979, Tabla No.4 y Figuras No.1, 2 y 3, mostró la importante influencia de el grupo sanguíneo ABO de los donadores de plasma. Los crios del grupo A contienen en promedio 28% más actividad de factor VIII que los crios del grupo O. Tal reporte también dio sugerencias, pero no concluyentes, evidencias de otras dos variables que influyen en la calidad del crío. Estas son, la elección del anticoagulante (Dextrosa-fosfato-citrato CPD o Dextrosa-citrato-acido ACD) y la duración del descongelamiento del plasma.

En el presente estudio, toda la sangre donada fue obtenida y subsecuentemente procesada en el Centro Regional de Transfusión de Sangre en Manchester.

3. MATERIALES Y METODOS

Los crios fueron preparados usando donaciones de sangre recolectada en bolsas de PVC conteniendo como anticoagulante ACD o CPD. La sangre fue almacenada por periodos de tiempo variable (2, 4 o 18 horas) antes de la separación del plasma por centrifugación. El plasma así separado fue muestreado y congelado inmediatamente. Para la preparación de cada crio se usaron 180 ml de plasma y la temperatura de congelamiento fue de -70 grados.

La prueba para la determinación de la actividad del factor VIII fue hecha usando el método en dos etapas de Biggs y cols., 1955, Figura No. 4. Los ensayos fueron analizados relacionando el log. del tiempo de coagulación con el log. de la concentración y la validez estadística fue probada de acuerdo al criterio usual (European Pharmacopoeia, 1971). Únicamente los resultados válidos fueron usados.

a) EXPERIMENTO PRINCIPAL

(A).-12 donaciones de sangre (6 grupo O y 6 grupo A) fueron recolectadas en anticoagulante ACD. Estas fueron divididas en 2 lotes de 6 donaciones, cada lote con 3 del grupo A y 3 del O.

Lote No. 1.-Estas 6 donaciones fueron centrifugadas tan pronto como fue posible después de la recolección y el plasma de cada bolsa fue exprimido dentro de otra. Inmediatamente después se mezcló el contenido y alícuotas de 6 X 180 ml fueron transferidas a bolsas y estas congeladas para la producción del crio. El plasma sobrante fue muestreado y congelado a -30°C . La operación total desde la recolección de la sangre, congelamiento y toma de alícuotas llevó aproximadamente 4 horas.

Lote No. 2.-Las restantes 6 donaciones fueron separadas después de 18 horas de la noche (18 horas) a 4°C . Alícuotas de plasma fueron tomadas y congeladas como en el lote No. 1

(B).-12 donaciones de sangre (6 del grupo O y 6 del grupo A) fueron recolectadas en anticoagulante CPD. Dos lotes fueron preparados y congelados como en el caso (A).

(C).-En esta etapa, 6 alícuotas de plasma congelado de cada lote A1, A2, B1 y B2 fueron puestas en las mismas condiciones iniciales. Tres alícuotas de cada sección fueron descongeladas por una técnica rápida. Los 12 crios producidos fueron congelados y cada sobrenadante fue muestreado (las muestras también se congelaron). Las 12 alícuotas restantes se descongelarán lentamente y los crios producidos como sus sobrenadantes fueron también congelados.

Para propósitos del ensayo del factor VIII, los 24 crios fueron tratados como 3 réplicas de un set de 8 tipos de crio. Cada set fue dividido en dos bloques de 4 y cada uno ensayado de igual manera. Este proceso fue repetido 3 veces. Los dos ensayos de cada crio fueron combinados obteniendo el valor medio del logaritmo de la potencia estimada cuando estas estaban estadísticamente homogéneas o como el significado aritmético de el logaritmo de las potencias estimadas cuando los valores son heterogéneos. El análisis de la variancia fue efectuada sobre el logaritmo de las potencias estimadas.

b) EXPERIMENTO ADICIONAL

32 donaciones de sangre (16 grupo O y 16 grupo A) fueron recolectadas en anticoagulante CPD. Ocho de cada grupo sanguíneo fueron separadas inmediatamente y 180 ml fueron tomados y puestos en bolsas. Las 16 alícuotas de plasma fueron inmediatamente congeladas, el total del tiempo entre la recolección de la sangre y el congelamiento de las alícuotas fue de 2 horas.

Las restantes 16 donaciones de sangre fueron dejadas toda la noche (18 horas) a 4°C antes de separar y congelar las alícuotas de 180 ml. Las 32 alícuotas de plasma fueron usadas para preparar crios por la técnica de descongelamiento rápido. Los ensayos para el factor VIII fueron efectuados sobre bloques de 4 crios cada uno conteniendo 2 de 2 horas (uno de grupo O y uno A) y 2 de 18 horas (uno de grupo O y uno A).

4. RESULTADOS

a) EXPERIMENTO PRINCIPAL

Los efectos sobre la actividad del factor VIII de los crios de las 3 variables están considerados en los resultados resumidos en la Tabla No. 5. El análisis de los datos originales sin transformar permitió hacer las siguientes comparaciones:

(i).- Los crios que provienen de CPD, dieron 76 unidades internacionales de factor VIII. Resultando significativamente mayor del obtenido con ACD, el cual dio sólo 55.

(ii).- A las 4 horas dio un valor arriba de 68 unidades internacionales de factor VIII/crio y el de 18 horas 62, esta diferencia es muy significativa. Una inspección más detallada reveló que esta diferencia fue debida enteramente a una de las 4 combinaciones de métodos de descongelamiento-anticoagulante, el ACD descongelamiento rápido.

(iii).- El descongelamiento rápido da 68 U.I. de factor VIII por crio y el lento da 62 U.I., diferencia que es significativa.

Este resultado no revela la situación verdadera, no obstante, una de las 4 combinaciones anticoagulante-tiempo (ACD/18 horas) mostró un retardado mejoramiento usando descongelamiento rápido. Este resultado y las anomalías discutidas en la sección (ii) podrán ambas ser explicadas si el resultado del ACD/18 horas/descongelamiento rápido está falsamente bajo (Tabla No. 6).

b) EXPERIMENTO ADICIONAL

Los resultados de este experimento, el cual fue designado para comparar las condiciones extremo de tiempo(edad) de separación de la sangre bajo el otro extremo de condiciones óptimas (CPD descongelamiento-rápido), están resumidos en la Tabla No. 7. El análisis de los datos originales sin transformar sugirió que la diferencia debida a el tiempo de separación de la sangre es significativa. La desviación estandar entre los crios en este experimento fue de más menos 52%. Una pequeña porción de éste es atribuible al error del ensayo y la mayor parte es un reflejo de la variación al azar en la actividad del factor VIII de la población normal y esto es particularmente debido a las diferencias de grupo sanguíneo.

El análisis confirmó que las diferencias debidas a grupo sanguíneo son altamente significativas, recalcando la necesidad de una balanceada población A/O en un experimento de este orden.

5. DISCUSION

Algunas de las variables que afectan la calidad de el crioprecipitado han sido investigadas y estas son: la influencia de el anticoagulante (ACD o CPD), la edad del plasma inicial y la velocidad de descongelamiento del plasma, Figura No. 2. Cada una de estas variables serán discutidas.

das separadamente.

a) ELECCION DEL ANTICOAGULANTE; CPD o ACD?

Los dos plasmas iniciales anticoagulados con CPD mostraron mayores niveles de factor VIII que los equivalentes con ACD. La diferencia en la actividad del factor VIII entre 4 y 18 horas fue proporcionalmente similar para CPD y ACD. Los valores registrados de cada uno están basados sobre un par de ensayos. Se sugiere la hipótesis de que es posible que -- una destrucción menor del factor VIII ocurra cuando la sangre donada -- viene en contacto con CPD en comparación con ACD, pero después de esto, -- la velocidad de disminución de la actividad del factor VIII es proporcionalmente similar con ambos anticoagulantes (Slichter y cols., 1976). La compatibilidad del CPD con el plasma puede observarse porque los crios -- derivados de plasma tratado con CPD mostraron significativamente mayor actividad que los tratados con ACD, Tablas No. 5 y 6 .

b) EDAD DEL PLASMA INICIAL

El experimento principal falló al querer demostrar una diferencia -- convincente entre los crios derivados de plasma de 4 y 18 horas. Sin embargo un experimento adicional, usando la combinación más favorable entre anticoagulante y tiempo de descongelamiento mostró un mejorado rendimiento (cuando fue usado plasma muy fresco), Tabla No. 7 .

Centros de transfusión con facilidades para la separación de la sangre completa dentro de un tiempo corto a partir de su recolección pueden capitalizar con éste efecto.

c) DURACION DEL DESCONGELAMIENTO

El rápido descongelamiento de las bolsas de plasma usualmente se realiza por inmersión de las mismas en un baño de agua circulante a temperatura entre 4 y 8°C durante aproximadamente dos horas (Slichter y cols., 1976).

Una desventaja de este método es que en el punto final del descongelamiento el plasma contiene una pequeña cantidad de hielo blando, que -- dificulta determinar precisamente el punto final (Slichter y cols., 1976) Otra desventaja es que en un medio acuoso de descongelamiento se puede rápidamente transmitir microorganismos a través de un inadvertido agujero sobre el plástico de la bolsa. Esta posibilidad al azar podría asumir

grandes problemas si el método de preparación involucra retornar el sobrenadante del crio a las células rojas. En el presente experimento se previnieron estas dificultades usando gabinetes para descongelar a 24°C e inmediatamente después se baja la temperatura del aire a 3°C para prevenir un sobredescongelamiento del plasma.

Tres de los 4 grupos de descongelamiento rápido dan significativamente mejores rendimientos de crio, en contraparte con esto, un grupo de descongelamiento (ACD/18 horas) mostró un superior rendimiento sobre su equivalente con descongelamiento rápido, Tablas No. 5 y 6. Esto dificulta una explicación satisfactoria de este resultado, no obstante, este inesperado resultado no fue investigado adicionalmente.

La selección del punto final correcto de descongelamiento puede ser una gran dificultad cuando se utiliza el método de baño de agua (Gunson y cols., 1979 y Burka y cols., 1975).

La rapidez del proceso junto con el control de el punto final del descongelamiento implícitos en el método, probablemente determinan los buenos rendimientos de factor VIII (Mason E.C., 1978).

Una nota de prevención debe ser pronunciada. En adición a los efectos de las tres variables principales discutidas en este documento, una adicional diferencia en el rendimiento resultará de cambios en otras variables tales como: el volumen de plasma procesado, la distribución de los grupos ABO dentro de los donadores de plasma y a los niveles de factor VIII en el plasma inicial. Además las diferencias en el rendimiento deberán ser vistas dependiendo de la metodología empleada en el ensayo de factor VIII (naturaleza del estándar, tipo de ensayo, reactivos etc.). Cada una de estas variables potenciales fueron cuidadosamente controladas en todo este experimento.

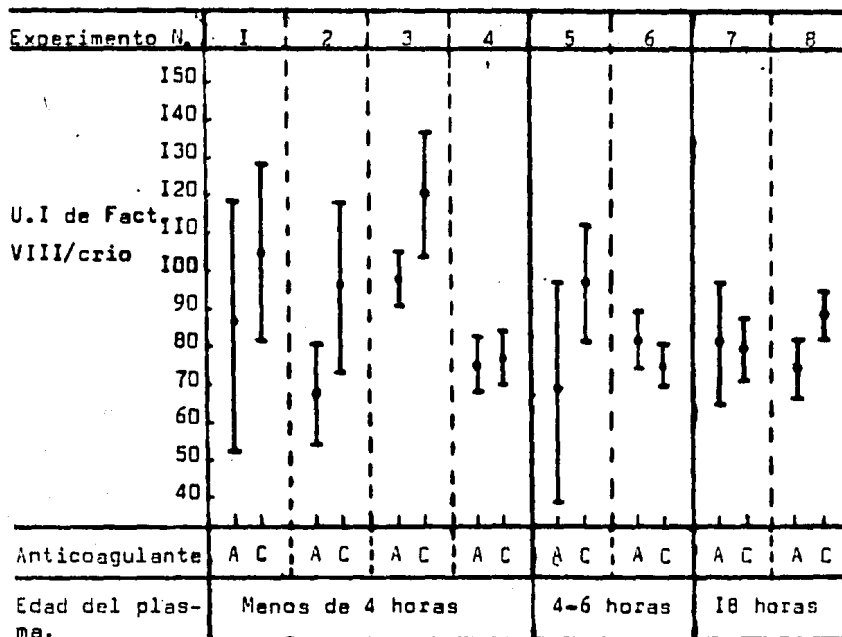


Figura No.1.- Comparación de la actividad del factor VIII entre plasmas anticoagulados con ACD y CPD, mostrando el promedio y su desviación standard (Gunson y cols., 1979)

Nota: A = ACD ; C = CPD ; Edad del plasma = Tiempo transcurrido desde la recolección del plasma hasta su congelamiento.

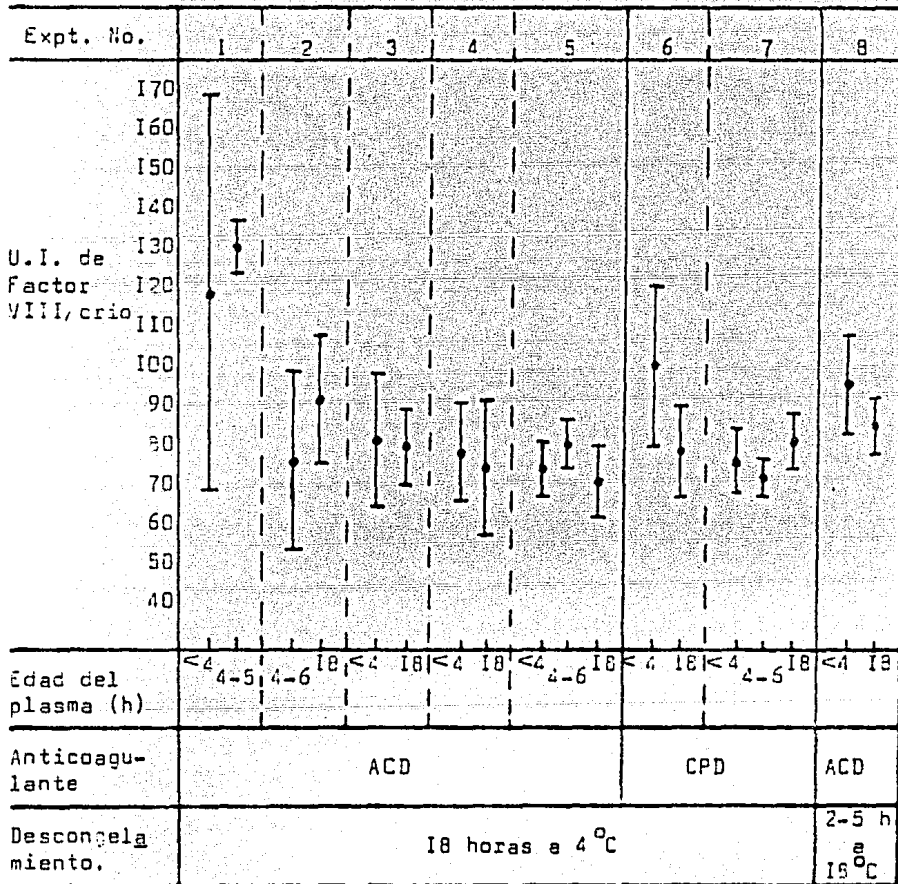


Figura No.2.-Comparación de la actividad del factor VIII entre crio-precipitados preparados a partir de plasma con diferentes edades(Gunson y cols.,1979)

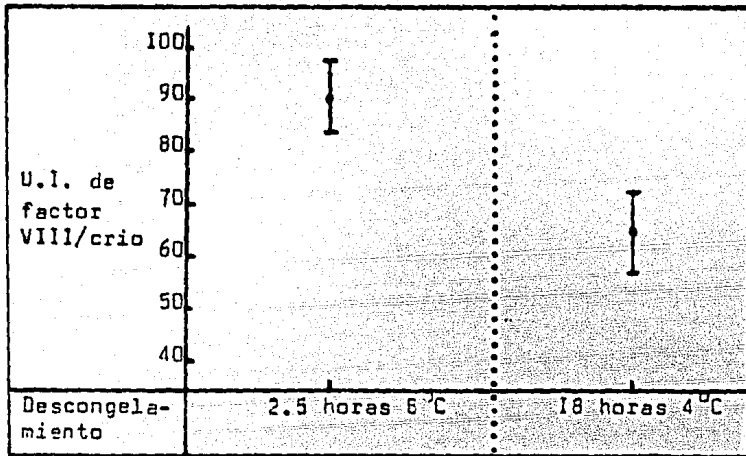


Figura No.3.-Comparación de la actividad del factor VIII entre crioprecipitados preparados por descongelamiento lento (18 horas a 4°C) y descongelamiento rápido (2.5 horas a 8°C)

La velocidad de centrifugación y el tiempo de congelamiento son variables que no parecen influir sobre la actividad del factor VIII, durante la obtención de crioprecipitados (Gunson y cols., 1979)

SOLUCION SALINA SUERO FOSFOLIPIDOS FACTOR V

0.85%

(Factor VII y -
Factor de Chris-
mas)

(Plaquetas)

0.1 ml.

0.1 ml.

0.1 ml.

0.1 ml.



Son puestos en un tubo

Baño de agua a 37°C

Adición de 0.1 ml. de
CaCl₂

Se hace funcionar el
cronómetro

Se mezcla el tubo

Incubación por 10 min.

Se mete el tubo en ba-
ño de hielo (para re-
tardar la reacción)

0.1 ml. de esta mezcla
es adicionado a 0.1 ml.
de plasma substrato y
0.1 ml. de CaCl₂ que se
encuentran en un tubo a
37°C

Se hace funcionar otro
cronómetro y se regis-
tra el tiempo de coagu-
lación.

Figura No.4.-Técnica de Biggs y Richards, para la determinación de la actividad del factor VIII (Generación de Tromboplastina).

Esta técnica no requiere el uso de sangre hemofílica y además está basada sobre la teoría de que el defecto de la hemofilia causa una falla en la formación de tromboplastina normal y los preparados de AHF ayudan a la generación de ésta.

Algunas observaciones sobre la técnica: Mientras el primer tubo está siendo incubado, una segunda mezcla es preparada de manera exactamente --
0.1 ml. de solución salina 0.85% es reemplazado por 0.1 ml.

de una de las diluciones de AHF. El CaCl_2 es adicionado al segundo tubo cuando el cronómetro marque 1 min. De la misma forma tubos conteniendo 0.1 ml. de cada una de las diluciones de AHF son preparados, un minuto de intervalo es dejado entre la recalcificación de cada mezcla.

Después de que el primer tubo ha sido incubado por 10 min. se quita del baño de agua a 37°C y es puesto en baño de hielo para retardar la reacción.

Cuando el cronómetro registre 11 minutos, el segundo tubo es puesto en el baño de hielo y es trabajado como el primer tubo, a los 12 minutos el tercero y así todas las diluciones.

Los Centros de Transfusión Regional en Inglaterra y Gales han estudiado las siguientes variables involucradas en la preparación de crioprecipitados: Grupo sanguíneo del donador, Tipo de anticoagulante usado (ACD o CPD), Condiciones de congelación, Descongelamiento y centrifugación del plasma y Edad del plasma inicial.

A continuación se presentan tablas y figuras que ilustran los resultados obtenidos.

Investigadores: H.H. Gunson, Centro de transfusión Regional, Oxford; E. Bidwell, Laboratorio de Fraccionamiento de Plasma, Oxford; I.S. Lane, Laboratorio de Productos Biológicos, Elstree, Hertfordshire; R.T. Wensly, Centro de Transfusión Regional, Manchester; T.J. Snape, Laboratorio de Fraccionamiento de Plasma, Oxford.

Tabla No. 4.- Actividad del factor VIII en crioprecipitados preparados a partir de grupos de plasma O y A. La actividad se determinó por el método de Biggs y colaboradores.

CTR	Unidades Internacionales de factor VIII/crio			
	Grupo O		Grupo A	
1	64.1	60.4	97.3	142.0
2	47.3	63.6	69.8	65.9
3	65.3	98.7	95.5	100.0
4	125.1	63.3	152.7	137.3
5	91.5	67.0	79.9	106.1
6	102.8	79.3	75.2	73.1
7	78.6	90.6	102.6	145.1
8	96.0	74.1	91.7	86.3
9	46.7	89.5	83.0	67.5
10	57.8	52.2	74.4	78.8
11	65.7	55.9	72.7	85.2
12	71.9	-	99.8	-
13	56.3	64.7	121.2	78.5
14	62.3	78.6	110.7	91.5
15	48.2	73.0	58.2	53.9
Promedio	70.2		89.7	

Tabla No 5.-Efecto sobre los niveles de factor VIII de tres variables:(i)anticoagulante,(ii)tiempo de separación de la sangre y (iii) tiempo de descongelamiento.

		Tipo de crioprecipitado	VIII UI/crio \pm % SD
ACD	4 h.	descongelamiento lento	54 \pm 8.7
		descongelamiento rápido	67 \pm 9.5
	18 h.	descongelamiento lento	54 \pm 6.1
		descongelamiento rápido	46 \pm 17
CPD	4 h.	descongelamiento lento	70 \pm 18
		descongelamiento rápido	84 \pm 14
	18 h.	descongelamiento lento	69 \pm 7.6
		descongelamiento rápido	82 \pm 16

Tabla No. 6: Niveles de VIII de los 4 plasmas vaciados usados en el experimento principal.

	ACD		CPD	
	4 h	18 h	4 h	18 h
	%	%	%	%
VIII				
UI/ml.	0.81 \pm 23	0.57 \pm 47	0.90 \pm 11	0.70 \pm 4

Tabla No.7. Un resumen de los resultados de un experimento usando crioprecipitados preparados a partir de donaciones simples de plasma para determinar los efectos extremos del tiempo de separación de la sangre sobre la actividad del factor VIII. (UI de factor VIII por crioprecipitado más menos % SD).

Grupo sanguíneo	Tiempo de separación		
	2 h.	18 h	media
O	62 UI ($\pm 60\%$)	51 UI ($\pm 33\%$)	56
A	90 UI ($\pm 26\%$)	61 UI ($\pm 32\%$)	74
Media	75	55	64

A - 4

CRIOPRECIPITADO PRE-REUNIDO PARA EL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA A
MENTITOVE JE; SPERO JA; RICHARDS WA; LEWIS JH; MONTGOMERY RR; GILL JC;
HASIBA U; WHEELER DV; SHERWIN JA; RUSSELL-VASKOV S; MARLAR RA; MAXWELL
NG y ASTER RH. (1983)

CRIOPRECIPITADO PRE-REUNIDO PARA EL TRATAMIENTO
DE HEMOFILIA A

1.-INTRODUCCION

Los concentrados liofilizados de factor VIII son los productos más --- comunmente usados por los pacientes con hemofilia A.No obstante,complica- ciones asociadas con el uso de concentrados de AHF han hecho que los en- fermos cambien a usar crioprecipitados como terapia alternativa.El razo- namiento para este cambio es que los crioprecipitados están preparados - a partir de plasma de donadores individuales y pueden tener un menor --- riesgo de transmisión de enfermedades que los concentrados preparados de la reunión de 5000 a 10000 donaciones de donadores pagados.Los hemofili- cos y sus médicos prefieren la utilización de concentrados liofilizados aunque éstos tienen una reducida recuperación del 15% comparada con el - 45% de los crioprecipitados.Los concentrados se disuelven y administran fácilmente,no requieren refrigeración y pueden ser transportados sin pro- blemas durante los viajes.Intentos para hacer los crioorecipitaaos más - fáciles de usar se han enfocado generalmente al incremento de la poten- cia de cada bolsa con el propósito de disminuir el número de unidades re- queridas para cada transfusión(Figura No. 5 y Tabla No.8)

En Milwaukee y Pittsburgh, los autores han atacado este problema median- te pre-reunión de los componentes en un pool de 2,4 y 6 bolsas al momen- to de la preparación,usando un "sistema abierto".Los autores reportan -- los resultados de sus experiencias en ambos Centros.

2.-MATERIALES Y METODO

1).-Recolecte la sangre entera en un paquete triple conteniendo como - anticoagulante CPDA-1(citrato-fosfato-dextrosa-adenina).

2).-Centrifuge la unidad a 4°C por 7 minutos a $4130 \times g$ (Milwaukee) o a $6460 \times g$ por 5 minutos (Pittsburgh) en una centrífuga modelo RC3B, Sor--- vall, DuPont Co., Wilmington, DE .

3).-Transfiere el plasma a una bolsa estéril.Póngala verticalmente en un congelador a -30°C (Modelo PCF48,Harris Manufacturing Co.,North Billi- rica,MA) Milwaukee,o en un congelador a -50°C (Modelo 68714-001,Forma -- Scientific,Mallinckrodt,Inc.,Marietta,OH) Pittsburgh.Hacer ésto cen- tro de las 6 horas siguientes a la recolección y dejar en el congelador toda la noche.Puede ser almacenado_o menos de -18°C para preparación posterior (Pittsburgh).

4).-Descongele el plasma congelado hasta que tenga ésta una apariencia lodosa en un baño de agua recirculante a 4°C y centrifuge a 4°C por 10 minutos a 4130 X g (Milwaukee) o 6460 X g (pittsburgh).

5).-Transfiera todo el sobrenadante excepto 20.ml. a la bolsa satélite restante y remover la pasta de crioprecipitado de las paredes por mezcla con el plasma.

6).-Seque el orificio de salida de la bolsa,inserte la punta de un paquete de transferencia de 300 ml. dentro de la bolsa original conteniendo el crioprecipitado usando técnicas estériles y transfiera el contenido dentro de la bolsa de 300 ml.

7).-En Pittsburgh,5 ml. de NaCl 0.9% son adicionados por bolsa de crioprecipitado a la bolsa de 300 ml. antes de la edición de el primer crioprecipitado.La mezcla de NaCl 0.9% y el crioprecipitado son regresados a la bolsa del crioprecipitado,remezclados y devueltos a la bolsa de 300 ml.,y este procedimiento se repite con cada subsecuente bolsa hasta que se han reunido 2,4,6 6 bolsas del mismo tipo sanguíneo ABO.

8).-Recongele el pool rápidamente y almacene por más de un año a menos de -18°C.

9).-Descongele los pools a 37°C cuando se necesiten para transfusión: 6 minutos para pools de 2 bolsas,11 minutos para pools de 4 bolsas y 16 minutos para pools de 6 bolsas.Haga la transfusión tan rápido como sea posible pero no después de 2 horas de haber hecho la descongelación.

3.-RESULTADOS

Con este método se obtienen crioprecipitados con una recuperación de -AHF del 48%.El producto resultó ser estéril después de haberse realizado una prueba para contaminación microbiológica.Cada pool de entre 2 y 8 --bolsas tienen en promedio 129.1 U/bolsa (Milwaukee) y 112.0 U/bolsa ----(Pittsburgh).El producto demostró tener uso terapéutico después de haberse hecho pruebas durante 5 años.

4.-DISCUSION

La pre-reunión de crioprecipitados en un "sistema abierto" en el Banco de Sangre,parece ser un método seguro,eficaz y relativamente conveniente.La potencia final del AHF es de 112 a 129 U/bolsa.La recuperación in vivo y el tiempo de vida media son normales.Aunque el sistema es abierto,-los estudios no indican que la contaminación bacteriológica sea un problema.Las reacciones alérgicas y febriles observadas son similares a ---

aquellas reportadas para crioprecipitados preparados rutinariamente. Se sugiere el uso de crioprecipitados compatibles con el grupo sanguíneo ABO para evitar que los glóbulos rojos de los pacientes sean cubiertos por isoaglutininas.

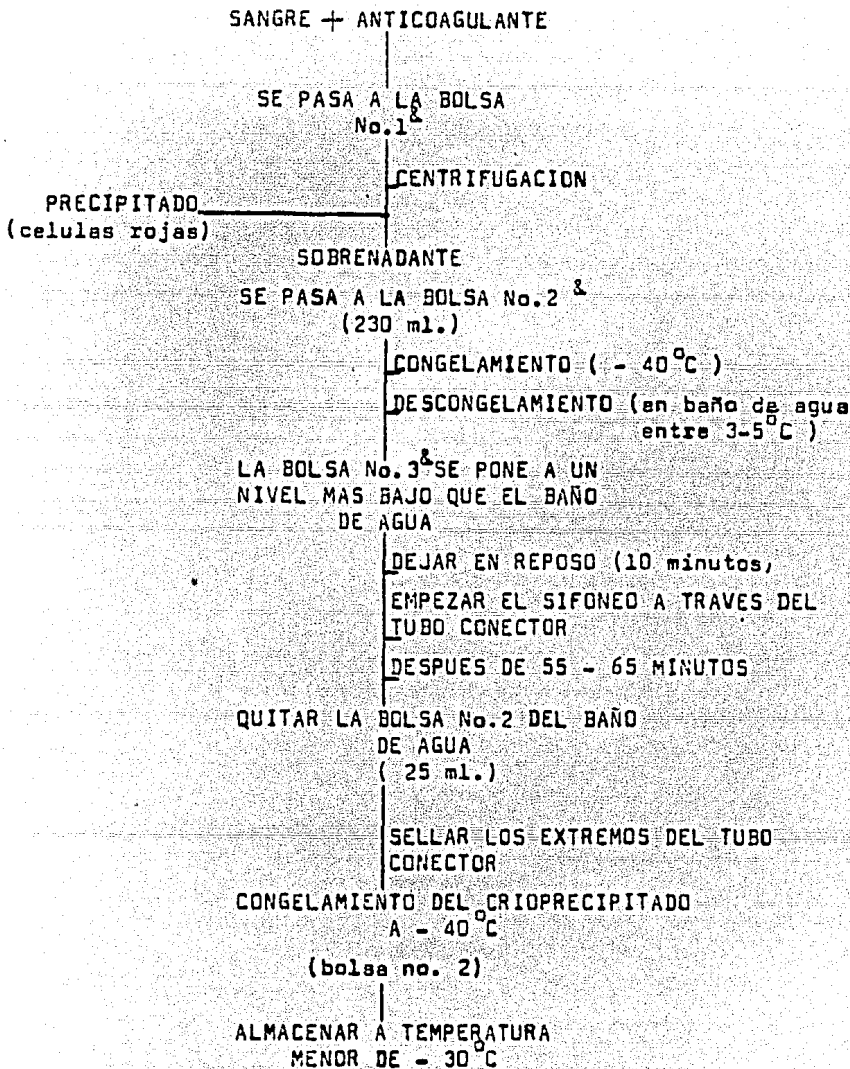


Figura No.5.-Método de "descongelamiento-sifón" para la producción de crioprecipitados (Mason E.C.,1978).Por esta técnica se obtiene producto con una recuperación de AHF del 72% y una potencia de 162 U/bolsa en promedio.

²Sistema de un paquete conteniendo 3 bolsas de plástico.

DESCONGELAMIENTO LENTO (12 - 18 horas) A TEMPERATURA DE 4°C

GRUPO SANGUINEO	FACTOR VIII U/ml		VOLUMEN PFC(ml.)	PROMEDIO DE RECUPERACION FACTOR VIII	POTENCIA DEL CRIO- PRECIPITADO U/bolsa
	PLASMA FRESCO	PLASMA FRESCO CONGELADO			
O	0.9	0.8	281	32.5	75
A	1.3	1.1	281	32.0	103
B	1.0	1.1	279	33.2	98
AB	1.2	0.9	280	30.6	98

DESCONGELAMIENTO RAPIDO EN BAÑO DE AGUA RECIRCULANTE A 4°C

GRUPO SANGUINEO	POTENCIA DEL CRIOPRECIPITADO U/bolsa
O	93
A	128
B	142
AB	140

Tabla No. 8.- En esta tabla se muestra la recuperación del AMF procedente de los grupos sanguíneos ABO. Se puede observar que el grupo O contiene únicamente el 75% del AMF presente en el plasma de donadores de los grupos A, B, y AB, y que el método de descongelamiento rápido (en baño de agua recirculante) da mejores rendimientos que el descongelamiento lento a temperatura de 4°C (Tomasulo P.A., 1980).

B - 1

UN NUEVO CONCENTRADO DE FACTOR ANTIHEMOFILICO DE ALTA POTENCIA
PRECIPITADO CON GLICINA
TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA CLASICA Y LA HEMOFILIA CON INHIBIDORES
KENNETH M. BRINKHOUS, EDWARD SHANBROM, HAROLD R. ROBERTS, WILLIAM P.
WEBSTER, LAJOS FEKETE Y ROBERT H. WAGNER. (1968)

UN NUEVO CONCENTRADO DE FACTOR ANTIHEMOFILICO DE ALTA POTENCIA
PRECIPITADO CON GLICINA

TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA CLASICA Y HEMOFILIA CON INHIBIDORES

1.-INTRODUCCION

Este concentrado de factor VIII precipitado con glicina, puede ser administrado a pacientes en soluciones 100 veces más concentradas que el plasma. Al parecer este producto es estable y no causa reacciones secundarias inmediatas.

Las intervenciones quirúrgicas pueden efectuarse sin peligro con la ayuda de esta fracción. Dos pacientes con hemofilia clásica complicada con presencia de inhibidor circulante de AHF, fueron tratados con grandes cantidades de la fracción de alta potencia, para neutralizar el inhibidor, apareciendo una mejoría clínica (Shapiro SS., 1967).

La fracción concentrada y purificada de factor VIII posee grandes ventajas sobre el plasma en el tratamiento de la hemofilia clásica (Webster y cols., 1965 y Abildgaard y cols., 1966). Por esta razón la utilidad clínica de los concentrados de AHF ha sido buscada por más de dos décadas. Se han investigado el uso de los aminoácidos como precipitantes del AHF (Wagner y cols., 1964) y con estos agentes, una serie de concentrados de fracciones adecuadas para el uso humano han sido desarrollados (Brinkhaus y cols., 1967; Webster y cols., 1965; Johnson y cols., 1966).

Hace 5 años se utilizaba como agente precipitante beta-alanina (irritante de mucosas), aminoácido difícil de separar durante la obtención del factor antihemofílico. Pequeñas concentraciones de éste producen efectos secundarios mínimos pero desagradables, cuando es administrado intravenosamente. Por esta razón la beta-alanina fue sustituida por la glicina como agente precipitante (Wagner y cols., 1968).

Este producto de 100 a 400 veces purificado es estable y relativamente soluble, de concentrados de arriba de 100 veces más potentes que el plasma. Puede ser utilizado en volúmenes pequeños para dar el nivel normal de AHF rápidamente y restaurar la hemostasis a pacientes sangrantes con hemofilia A. También la nueva fracción ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de la hemofilia con inhibidores de AHF circulantes.

2.-MATERIALES Y METODOS

La potencia del factor antihemofílico fue determinada mediante la técnica de tiempo de tromboplastina parcial, descrita en (Langdell y cols., 1953), Figuras No. 11, 12 y 13 .

El concentrado fue preparado mediante un fraccionamiento a gran escala de plasma humano (Brinkhous y cols., 1967). La materia prima para el lote fue el crioprecipitado obtenido de 200 a 500 bolsas de plasma citratado (sangre completa extraída en citrato al 4 %). El crioprecipitado fue disuelto y se le añadió polietilenglicol de peso molecular 6000, éste fue escogido porque sus soluciones son poco viscosas y no causa desnaturalización a temperatura ambiente (Polson y cols., 1964), Figuras No. 7 , 8 y 9 y Tabla No. 11 . El fibrinógeno fue selectivamente precipitado dejando casi todo el AHF en solución (Johnson y cols., 1966). En el paso final el AHF fue precipitado añadiendo glicina (Wagner y cols., 1964), Figura No. 10 y Tablas No. 12 , 13 y 14. Después de que el producto fue redissuelto en solución salina citratada se vació en viales y se liofilizó.

El producto liofilizado resultante fue almacenado a 5°C antes de utilizarse, figura No. 6 .

3.-RESULTADOS

El nuevo AHF de alta potencia es comparado con el plasma y con un concentrado de baja potencia en la Tabla No. 9 .

Una unidad de AHF es equivalente a aquella cantidad contenida en un ml. de plasma normal. Una unidad de inhibidor de AHF es definida como la cantidad que neutraliza una unidad de AHF en una hora a 37°C .

El nuevo AHF de alta potencia contiene 1050 unidades por vial y cantidades relativamente pequeñas de fibrinógeno. El lote presentado en este reporte está 162 veces purificado, pero otros lotes tienen cerca de 400 veces.

La Tabla No. 10 muestra los rangos de los valores de cuatro diferentes lotes de AHF de alta potencia. La concentración del factor antihemofílico por gramo de proteína varía de 1600 a 9500 unidades. El rango de los valores de purificación va de 110 a 380. Cerca de dos tercios de la proteína es fibrinógeno.

El nuevo AHF de alta potencia, precipitado con glicina, ha sido usado en cuatro situaciones diferentes en pacientes con hemofilia clásica severa: en el estado tranquilo, en crisis hemorrágicas, para las operaciones y en la hemofilia complicada por la presencia de inhibidor circulante de AHF.

4.-DISCUSION

La nueva fracción de AHF precipitada con glicina es estable, fácilmente se disuelve y puede ser administrada con jeringa. La mayor parte de los lotes (de 3000 unidades) pueden ser disueltos en una cantidad tan pequeña como 30 ml., Table No. 9 . Esta cantidad puede ser administrada mediante una jeringa y es usualmente suficiente para dar el nivel plasmático de AHF normal en un adulto hemofílico. Esta característica es obviamente ventajosa en el tratamiento de un episodio hemorrágico catastrófico.

Con las preparaciones del AHF de alta potencia como con el de baja se elimina la complicación de hipervolemia tan común en la terapia intensiva con plasma. El nuevo concentrado aún cuando es administrado en grandes cantidades no produce hiperfibrinogenemia.

El nuevo método de obtención de factor VIII es adaptable a la producción en gran escala.

La facilidad de preanalizar el producto permite el cálculo de la dosis necesitada para un episodio de sangrado, ventaja ésta no fácil de conseguir con el AHF crioprecipitado.

El material de AHF altamente purificado también promete ser útil en el tratamiento de hemofílicos con inhibidores de factor VIII. El inhibidor parece ser un anticuerpo y la reacción con el AHF resulta en la neutralización de ambos. Por lo que es razonable que el factor VIII administrado en cantidades calculadas para exceder lo requerido para la neutralización del inhibidor debe servir para la hemostasis.

La facilidad de conseguir esta fracción y la sencilla administración pueden permitir a los hemofílicos ser tratados en casa por miembros de su familia entrenados. Aún más, las fracciones de AHF altamente purificadas pueden ser herramientas útiles para los estudios básicos requeridos para dilucidar el papel de éste en la hemostasis.

El material de este estudio fue proporcionado por la división Hyland, de los Laboratorios Travenol.

Tabla No. 9.-Comparación de las fracciones de plasma precipitadas -- con glicina. Los análisis de AHF están basados en el contenido de un vial del concentrado liofilizado.

CARACTERISTICAS	PLASMA	AHF PRECIPITADO-GLICINA	
		BAJO	ALTA POTENCIA
Volúmen (ml.)	300	30	10
Unidades de AHF	300	216	1,050
Fibrinógeno (mg.)	1,050	610	310
Proteína total (mg.)	19.6	0.7	0.45
Purificación del AHF	1	20	162
Concentración del AHF (U/ml.)	1	7.2	105
Concentración del AHF (%)	100	720	10,500

Tabla No.10.-Comparación del plasma con diferentes lotes de AHF precipitados con glicina.

LOTE No.	PROTEINA TOTAL (g)	FIBRINO-GENO (g)	CONCENTRACION DE AHF (unidades/g de proteína total).	No. DE VECES PURIFICADO
1	1	1,600	110
2	1	0.69	2,300	160
3	1	0.70	1,900	140
4	1	5,500	380
PLASMA	1	0.05	14.3	1

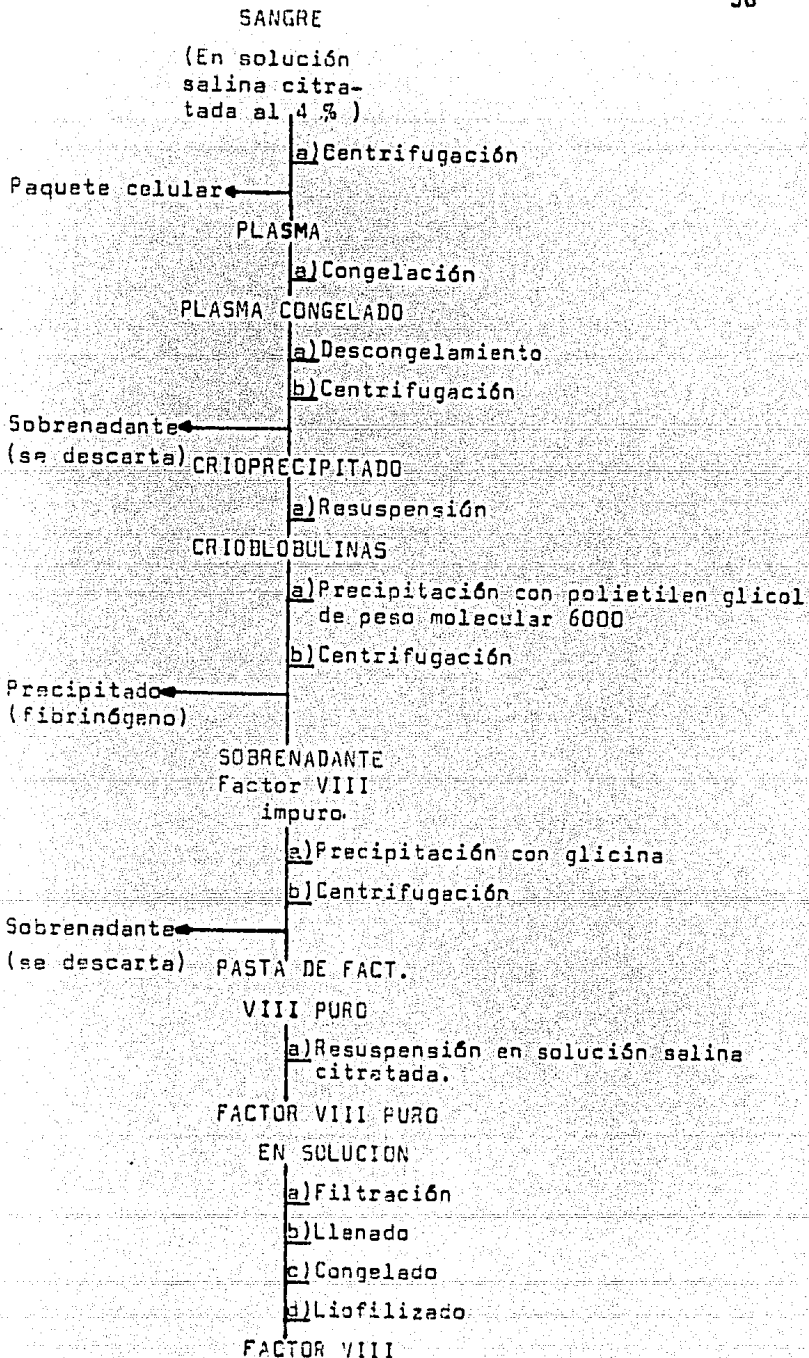
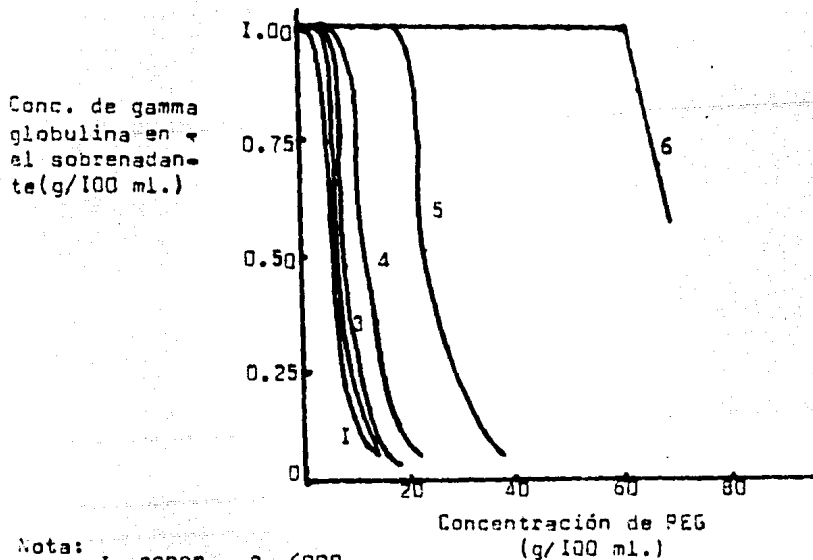


Figura No. 5.-Método de Brinkhous y colaboradores para la obtención de factor antihemofílico humano.

Tabla No. 11.-En esta tabla se presentan los resultados de los experimentos previos realizados por Polson y colaboradores para seleccionar el polímero lineal de alto peso molecular que se utilizará para el fraccionamiento de plasma.

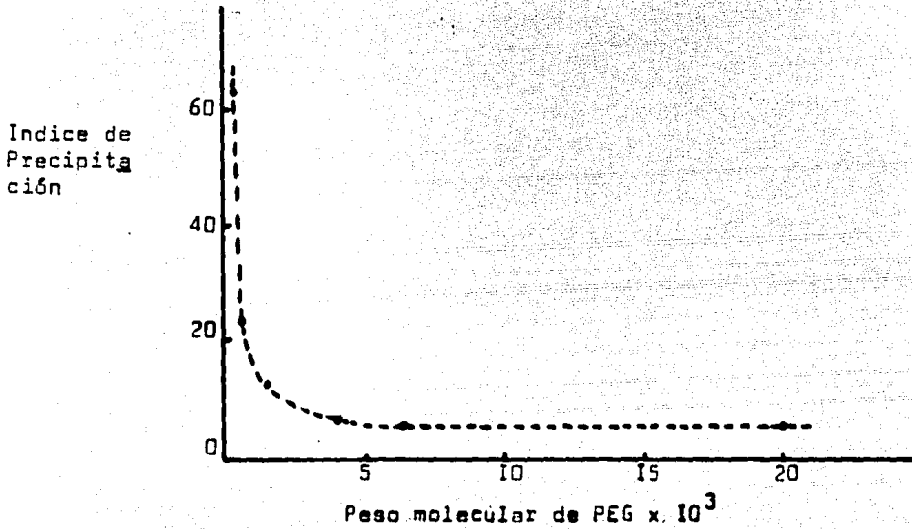
Polímero	Soluciones altamente viscosas	Causan desnaturalización de las proteínas
Nonilfenil-etocilato(NPE)	X	X
Polivinil alcohol(PVA)	X	X
Polivinil pirrolidina(PVP)	X	X
Dextran	X	NO
Poliétilen glicol(PEG)	NO	NO

Figura No. 7 .Curvas de precipitación obtenidas por Polson, sobre gamma globulina,utilizando PEG con diferentes pesos moleculares.



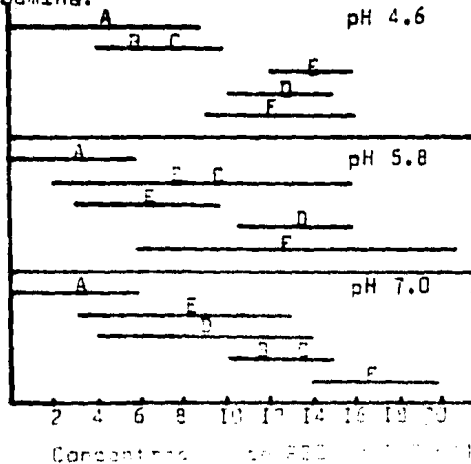
Nota: 1 20000 , 2 6000
 3 4000 , 4 1500
 5 600 , 6 300

Figura No. 8 .Indices de precipitación de los diferentes pesos moleculares de PEG. (Obtenidos por Polson)



Nota: Índice de Precipitación - Se define como la cantidad de polímero requerido para precipitar el 50% de la proteína contenida en una solución de 1 g/100 ml. de gamma globulina en buffer de fosfatos 0.066 M (pH 7.2) a -- 21° C.

Figura No. 9 .Rangos de concentración de PEG donde los diferentes componentes del plasma son precipitados a tres diferentes pH. La máxima cantidad de un componente es precipitado cerca del centro de las líneas horizontales. Método de Polson. Donde A, fibrinógeno; B, alfa-1 globulinas; C, alfa-2 globulinas; D, beta globulinas; E, gamma globulinas; F, albúmina.



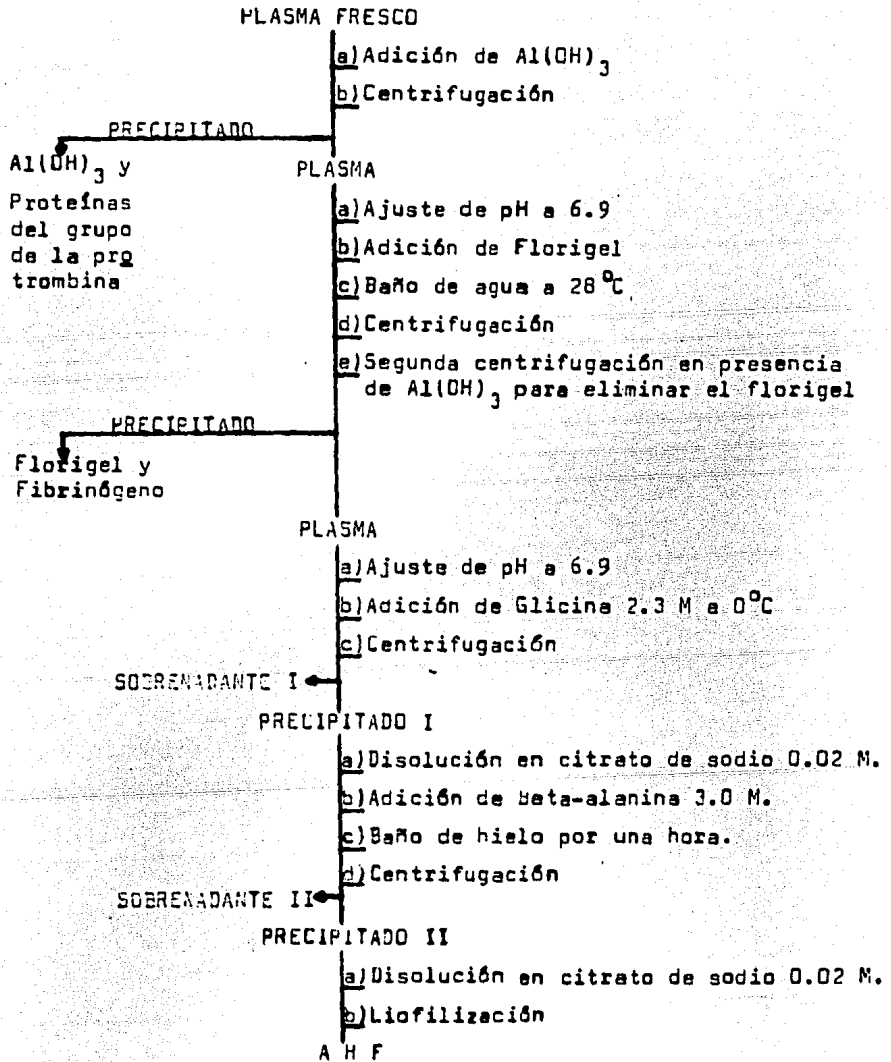


Figura No.10. Método de Wagner y colaboradores para la obtención de AHF de plasma canino. Esta técnica también es aplicable para la extracción de AHF de plasma humano.

Tabla No.12 .-Precipitación de proteínas plasmáticas por aminoácidos a una concentración de 1.5 M.(Metodo de Wagner y colaboradores). Para este experimento se utilizó plasma canino.

	Proteína precipitada. g/100 ml	Proteína rendimiento. %	AHF rendimiento. %	Número de veces purificado	Fibrinógeno precipitado mg%
Acido-alfa-aminobutírico.	0.044	0.6	8	13	NO
Alanina	0.185	2.6	68	26	26
Glicina	0.285	4.1	92	22	51
Acido-gamma-aminobutírico.	0.265	3.8	81	24	54
Beta alanina	0.173	2.5	76	31	33

Tabla No.13 .-AHF precipitado con glicina por el método de Wagner y colaboradores. Para este experimento se utilizó plasma canino.

Molaridad de la Glicina	Rendimiento del AHF (%)	Número de veces purificado
2.0	27	78
2.0	45	339
2.0	48	306
2.0	55	311
2.0	62	555
2.0	94	382
2.3	32	38
2.3	103	220
2.3	110	272

Tabla No.14 .-Precipitación con aminoácidos de AHF humano y bovino.
Método de Wagner y colaboradores.

		Rendimiento de AHF %	Número de veces purificado
GLICINA 1.5 M.	Bovino	66	54
	Humano	12	9
BETA-ALANINA 1.5 M.	Bovino	6	15
	Humano	25	17
BETA-ALANINA 2.0 M.	Bovino	23	36
	Humano	30	14

Nota: Un efecto colateral resultado del uso de beta-alanina es su acción irritante sobre la piel, mucosa oral y conjuntiva.

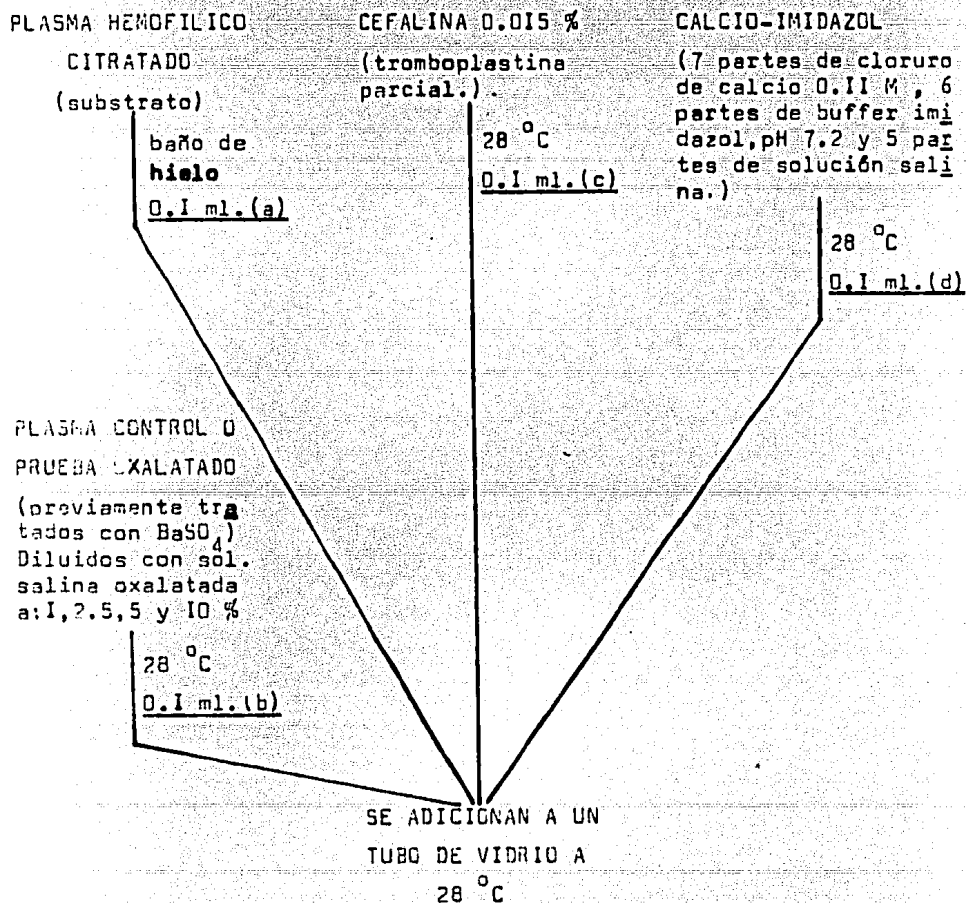
$$\text{Número de veces purificado} = \frac{\text{gm\%}}{\text{fracción gm\%}} \times \frac{\text{AHF(\%)}}{100}$$

Donde: gm% = concentración normal de proteína en plasma.

fracción gm% = concentración de proteína en la fracción.

AHF(%) = actividad de AHF en % de plasma inicial.

Figura No.11 .-Método de Langdell y colaboradores para la determinación del tiempo de tromboplastina parcial.Los tiempos de coagulación para cada dilución de cada plasma son determinados por triplicado y promediados.



Nota: El orden de adición de los reactivos es como sigue, a, b, c, d. El BaSO₄ adsorbe de el plasma la trombina y el factor acelerador del plasma, pero no al AHF.

Figura No.12 .-Tiempo de tromboplastina parcial de mezclas de plasmas normales y hemofílicos. Esta gráfica fue obtenida por Langdell, Wagner y Brinkhous.

El método está basado sobre la observación de que incrementos en la cantidad de AHF, dentro de los límites anotados en la figura, causan progresivo acortamiento de el tiempo -- de tromboplastina parcial del plasma hemofílico.

La actividad del AHF puede ser expresada como un % del normal. En el ensayo, a cantidades constantes de material probado para act. de AHF se le adicionó una cantidad constante de plasma hemofílico. Los tiempos de coagulación de las mezclas son determinados después de la adición de una cantidad standard de tromboplastina y cloruro de calcio.

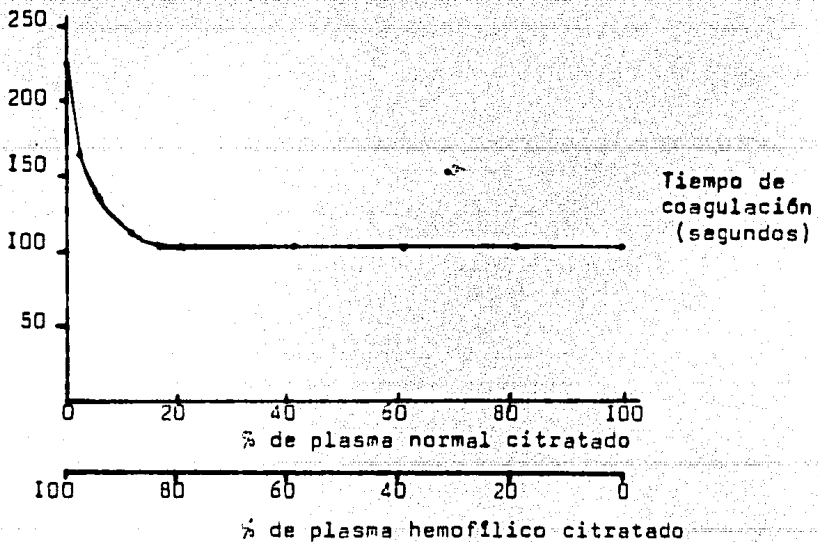
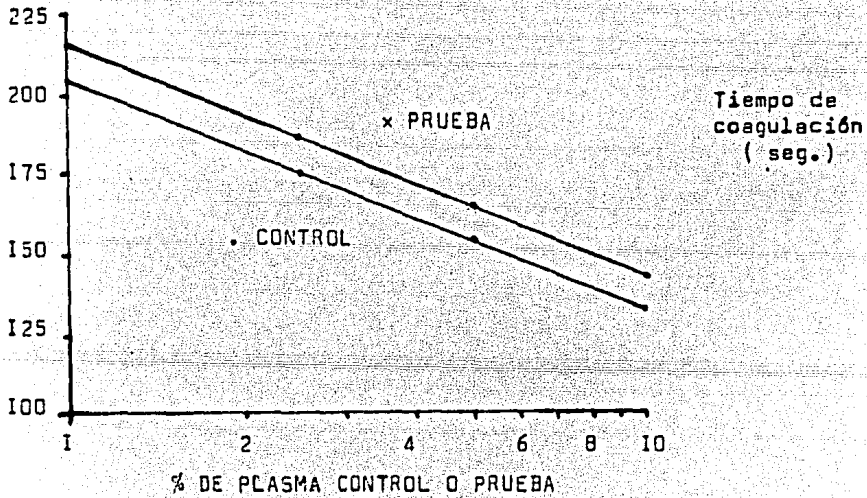


Figura No.13.-Ilustración gráfica para el cálculo de la actividad relativa del AHF. Datos obtenidos por el método de tiempo de tromboplastina parcial(Langdell y colaboradores). El tiempo promedio de coagulación está trazado contra el % de el plasma prueba o control usado, este dato está indicado sobre una escala logarítmica.



Nota: Cálculo de la actividad relativa del factor VIII del plasma prueba: $\frac{\% \text{ de plasma control}}{\% \text{ de plasma prueba}} \times 100 = \% \text{ de la actividad del AHF en el plasma prueba}$

B - 2

AI SLAM I EN TO Y CA RA TE RI ZA CI ON DE L FA CT OR V III HU MA NO
LE GA Z ME, SCH MER G, CO UN TS RB Y DA VIE EW. (1973)

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR VIII HUMANO

1.-INTRODUCCION

El método descrito aquí produce un concentrado de factor VIII con una purificación de aproximadamente 500 veces a partir de la fracción crioprecipitada del plasma humano. El procedimiento de aislamiento involucra la adsorción de contaminantes con $Al(OH)_3$, cromatografía en columna sobre citrato trisódico-celulosa, precipitación con concanavalina A y una etapa de filtración en gel de agarosa.

Con este procedimiento, un producto relativamente estable de alta pureza puede ser hecho en cantidades de miligramos. Esta preparación es apropiada para estudios fisicoquímicos y biológicos.

2.-MATERIALES Y METODO

La preparación de factor VIII purificado fue obtenida a partir de crioprecipitados como material inicial. En un típico experimento, el contenido de cada 10 bolsas de crioprecipitados fueron disueltos individualmente - en 5 ml. de citrato 0.05 M y ácido epsilon-amino-n-caprónico 0.5 %, pH 6.8 a 37°C y transferidos a tubos de centrifuga de poliestireno conteniendo 1 ml. de $Al(OH)_3$ al 30 %. Cada bolsa es enjuagada con 5 ml. de buffer citrato y la solución de lavado es transferida al tubo de centrifuga correspondiente. Después de una inicial mezcla con el hidróxido de aluminio, el contenido de los tubos es puesto en un vaso y agitado por 15 min. a temperatura ambiente. El precipitado de $Al(OH)_3$ es removido por centrifugación a 16000 X g por 10 min. a 22°C. El sobrenadante (aproximadamente - 140 ml.) fue puesto en una columna cromatográfica de citrato de calcio-celulosa. Esta columna fue preparada con 150 g de citrato de calcio prelavado con 1 litro de HCl y 150 g de polvo de celulosa suspendida en un litro de citrato 0.05 M y ácido epsilon-amino-n-caprónico 0.5 %, pH 6.8 dentro de una columna de polipropileno (7.5 X 30 cm.). El crioprecipitado adsorbido con $Al(OH)_3$ fue vaciado dentro de la columna, seguido de intensivos lavados con buffer citrato hasta que el efluente tuvo una adsorción de menos de 0.05 a 280 nm., lo cual fue logrado aproximadamente con 1.8 a 2.0 litros. Después del inicial lavado con citrato, la columna fue transferida a un cuarto frío (4°C) y el factor VIII se extrajo con una solución conteniendo E.D.T.A sal tetrasódica 0.1 M, buffer tris-HCl 0.02 M y ácido epsilon-amino-n-caprónico 0.5 %, pH 8.5, a una tasa de flujo de -

8 a 10 ml. por minuto. El flujo fue reducido a 2.5 ml. por minuto después de que los primeros 400 ml. de solvente habían pasado por la columna y - fracciones de 25 ml. fueron tomadas.

Las fracciones conteniendo la mayoría del factor VIII (aproximadamente 220 ml.) fueron mezcladas con un décimo de volumen de PEG al 40 % en NaCl 0.25 M e imidazol 0.2 M, pH 6.5. Esta solución fue entonces puesta en un baño de hielo-agua por 10 min. después de lo cual el precipitado fue centrifugado a 4°C y 7000 X g por 10 min.. El sobrenadante fue entonces - desechado y el precipitado disuelto en 15 a 20 ml. de KCl 0.02 M y bu--- ffer tris-HCl 0.02 M, pH 7.4 a 37°C . Adicional purificación del factor -- VIII fue llevada a cabo por adición de 1.8 ml. de concanavalina A (25 - mg por ml. de disolvente en NaCl 1.0 M). La solución fue mezclada y en- tonces dejada a temperatura ambiente por 10 min.. La mezcla fue centrifu- gada a temperatura ambiente por 5 min. a 2000 X g y el precipitado fue - redisolto a 37°C en 2 ml. de NaCl 0.25 M - imidazol 0.02 M (pH 6.5) - conteniendo metil-gamma-D-glucopiranosido al 10 % y azida de sodio 0.03% y dejado toda la noche a 4°C .

La etapa final en la purificación fue el paso de la solución de concanavalina A - glicoproteína (2.5 a 3.0 ml.) a través de una columna de agarosa (1.5 X 100 cm.) pre-equilibrada con la misma solución buffer de -- metil-gamma-D-glucopiranosido, como se describió antes. La extracción del - factor VIII fue hecha a una tasa de flujo de 15 ml. por hora, muestras de 3 ml. fueron tomadas después de haber pasado 40 ml. por la columna. El -- contenido de los primeros 4 tubos, conteniendo aproximadamente el 75 % del factor VIII fue precipitado con un volumen de 1/10 de PEG al 40 % (15 -- min. a 0°C) seguido de centrifugación a 16000 X g por 10 min. a 4°C . El factor VIII precipitado fue disuelto en 2,0 ml. de buffer tris-HCl 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, y azida de sodio 0.03 M y almacenado a 4°C. Bajo estas condiciones la actividad del factor VIII fue estable por aproximadamente 2 semanas; después de 4 semanas la actividad bajó aproximadamente el 50 %. Cuando fue rápidamente congelado y almacenado a - 80°C , la estabilidad -- fue mejorada (Figura No. 14)

En los más recientes experimentos, la solución de crio-precipitado adsorbido con $Al(OH)_3$ fue agitado por 15 min. a 20°C con 150 g de citrato de - calcio prelavado en 250 ml. de buffer citrato 0.05 M. La mezcla pastosa -- fue entonces centrifugada por 5 min. a 7000 X g y a 16°C, el citrato de --

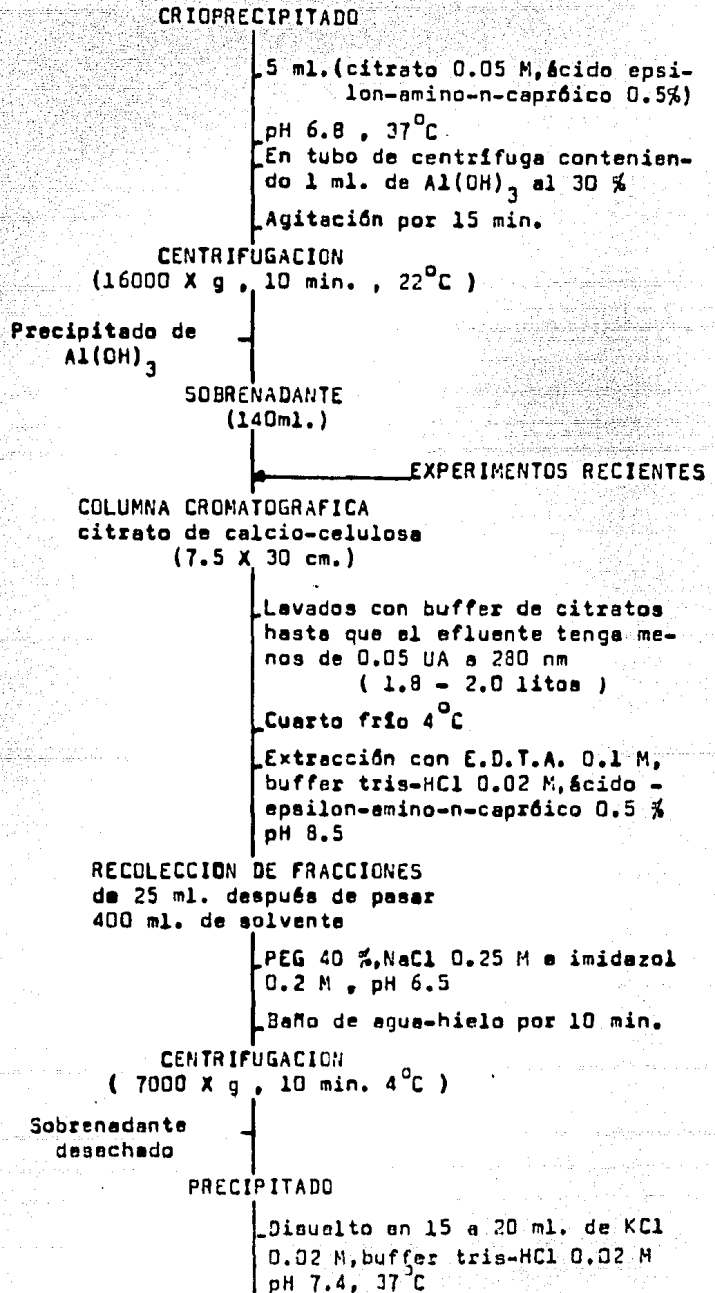
calcio entonces fue lavado 2 veces más con 500 ml. de buffer de citrato y centrifugado a 4°C . El citrato de calcio precipitado fue entonces mezclado con 1 litro de buffer citrato conteniendo 150 g de polvo de celulosa y --- puesto en una columna de polipropileno de 7.5 X 30 cm. El factor VIII fue extraído como se describe anteriormente. Esta modificación favoreció el procedimiento de purificación por 1 o 2 horas.

3.-RESULTADOS Y DISCUSION

Las etapas de purificación del factor VIII humano y el rendimiento de -- una preparación típica se muestran en la Tabla No.15 .El material inicial (crioprecipitados) están entre 5 y 20 veces purificados y un rendimiento -- de 25 a 45 % con respecto al plasma.Cantidades remanentes de factor VII,IX ,X y protrombina fueron removidas del crioprecipitado mediante una etapa -- de adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$.La etapa siguiente fue pasar el concentrado a través de una columna cromatográfica conteniendo citrato de calcio-celulosa -- (Figura No. 15 ,cuadro superior).Una mayor porción de proteína aplicada a la columna apareció en el solvente inicial y contenía aproximadamente -- 10 % del factor VIII,mientras que la cantidad mayor de factor VIII fue extraída en el segundo pico.La etapa final involucró la precipitación del -- factor VIII con concanavalina y una subsecuente filtración en gel sobre agarosa (Figura No.15 ,cuadro inferior).El factor VIII apareció en el -- primer pico de la columna de agarosa separado de la concanavalina y de las trazas de fibrinógeno y otras proteínas contaminantes.Unicamente una porción de este pico,como se indica con la barra,fue reunida y concentrada -- por precipitación con PEG.La purificación del factor VIII humano con respecto al crioprecipitado fue de aproximadamente 500 veces,lo que equivale a una purificación con respecto al plasma de 3000 a 5000 veces.El factor -- VIII humano preparado por este método está libre de fibrinógeno,protrombina, factores V,VII,IX,X y XIII.

El producto obtenido siguiendo los lineamientos descritos anteriormente, fue usado para obtener el peso molecular del mismo y su composición química,entre otras determinaciones.

Figura No.14.-Método de obtención de factor antihemofílico humano
(Legaz ME, Schmer G, Counts RB y Davie EW, 1973.)



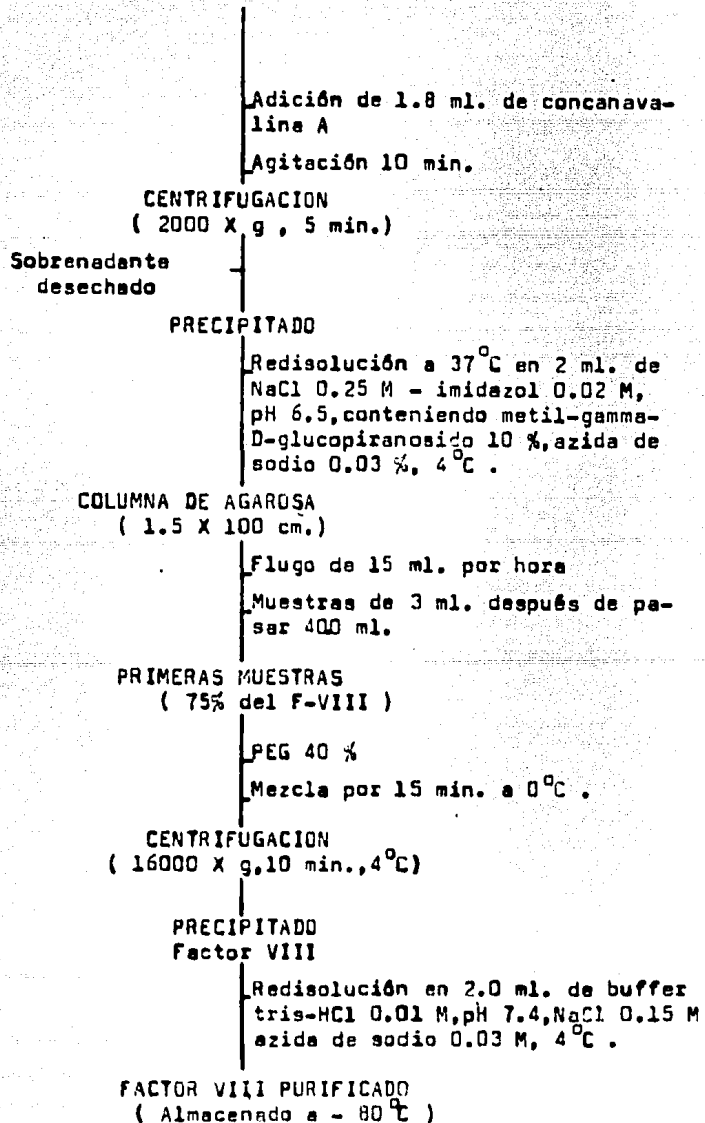
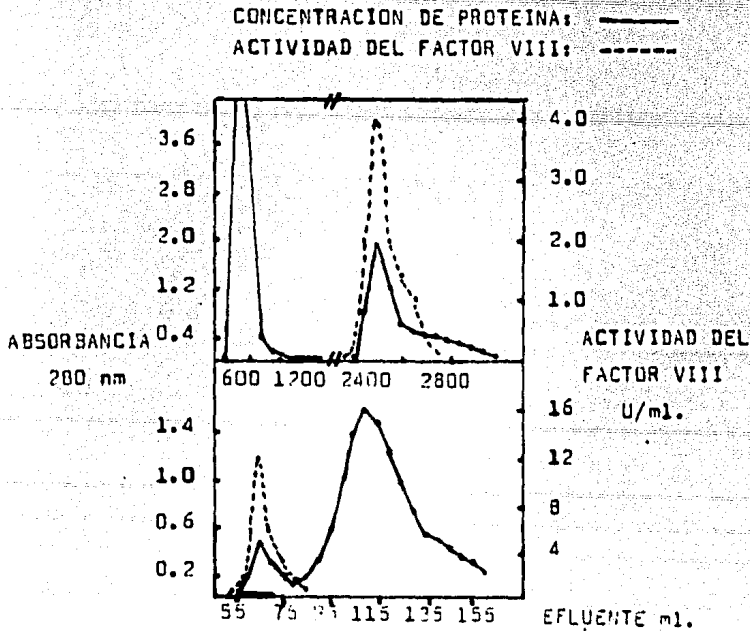
CONTINUACION

Tabla No.15.-Purificación de factor VIII a partir de crioprecipitados.
El material inicial empleado fue crioprecipitados de 10 -
donadores voluntarios, esto equivale aproximadamente a ---
2600 ml. de plasma (donaciones individuales).

ETAPA DE PURIFICACION	PROTEINA TOTAL mg.	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg.	RENDI- MIENTO	PURIFI- CACION
CRICPRECIPITADO	11600	750	0.065		1
Al(OH) ₃	9990	750	0.075	100	1.1
CITRATO DE CALCIO- CELULOSA	96	260	2.5	34.7	38.5
CONCAVALINA A- AGAROSA	5	170	34	22.6	523

Figura No.15.-Cromatografía en columna de citrato de calcio-celulosa -
del crioprecipitado adsorbido con Al(OH)₃, cuadro supe-
rior. Filtración sobre gel de agarosa, cuadro inferior.



B - 3

SEPARACION DE FIDRINOGENO DEL FACTOR ANTIHEMOFILICO POR MEDIO
DE DEFIBRASA

LOPACIUK S., LATALLO Z.S., BYKOWSKA K. y DASZYNSKI. (1975)

SEPARACION DE FIBRINOGENO DEL FACTOR ANTIHEMOFILICO, POR MEDIO DE DEFIBRASA

1.-INTRODUCCION

Uno de los problemas más comunes en todos los métodos de purificación del factor VIII es la remoción del fibrinógeno. Adsorción con betonita - o florigel, cromatografía en columna, precipitación con ácido tánico, filtración en gel sobre agarosa y precipitación con PEG (Johnson y cols., 1968) han sido métodos empleados con el propósito de remover el fibrinógeno. Muchas de estas técnicas han tenido solo un éxito parcial o han producido resultados inconsistentes.

Otra posibilidad consiste en el uso de enzimas (semejantes a la trombina) del veneno de serpiente. Algunas de estas enzimas convierten el fibrinógeno en fibrina pero no necesariamente afectan al factor VIII. En este trabajo, la preparación de una enzima parecida a la trombina del veneno - de Bothrops atrox (serpiente) fue usado con el propósito de remover el fibrinógeno.

2.-MATERIALES Y METODO

El plasma citratado fue preparado a partir de sangre venosa de voluntarios normales, a la cual se le adicionó 1/9 de volumen de citrato trisódico 3.8 %. La sangre fue centrifugada a 1800 X g por 30 minutos.

El plasma normal citratado fue incubado con diferentes concentraciones de defibrasa (enzima parecida a la trombina, Pentapharm AG, Basel, Switzerland) en buffer veronal (11.75 g de dietilberbiturato de sodio y 14.67 g de NaCl disueltos en una mezcla de 1570 ml. de agua destilada y 430 ml de HCl 0.1 N , pH 7.35). Después de 1 y 4 horas respectivamente, 0.2 ml. de la mezcla de incubación fue removida de cada tubo, diluida 1:20 y 1:40 con buffer conteniendo anti-defibrasa 1 ml./100 ml. (una inmunoglobulina) y ensayada para factor VIII después de retirar el fibrinógeno formado dentro de las 3 o 4 horas siguientes a la incubación.

Posteriores experimentos fueron llevados a cabo utilizando una fracción precipitada en presencia de dextran, como material inicial. Dextran, - de peso molecular promedio 70,000, fue adicionado a plasma humano con ACD a una concentración final de 3 % v/v. El plasma fue dejado toda la noche a 4°C para que precipite. El crioprecipitado fue recuperado por centrifugación, lavado una vez con solución de dextran al 3 % (en NaCl 0.15 M) y

entonces redissuelto en un volumen de solución de citrato salina (1 parte de citrato trisódico 3.8 % más 5 partes de NaCl 0.15 M, el pH se ajustó a 6.8 con HCl 1 N) igual a 1/20 del plasma inicial. A cada 100 ml. de esta preparación diluida 1:1 con agua destilada se le adicionó 0.5 ml. de defibrasa. El fibrinógeno fue rápidamente removido y la mezcla de incubación se dejó toda la noche a 4°C . Al siguiente día, la fibrina residual y otros materiales precipitados fueron separados por centrifugación.

Para concentrar el factor VIII de la fracción libre de fibrinógeno una etapa de precipitación en frío con etanol fue empleada (Figura No.16).

El concentrado anterior fue aplicado a una columna de Sephadex 6B (1 X 60 cm. de tamaño) y extraído con buffer salina citratado conteniendo citrato trisódico 0.014 M, NaCl 0.13 M y ácido epsilon-aminocaproico 0.2 M (pH 6.5).

3.-RESULTADOS

Como se puede ver en la Tabla No. 16 ,prácticamente no se observó pérdida o incremento de actividad del factor VIII entre las muestras procesadas con defibrasa y las muestras de plasma control que fueron incubadas por el mismo periodo.

El fibrinógeno, el cual se formó en los plasmas tratados con defibrasa, fue removido al final de la incubación (dentro de las 3 o 4 horas siguientes) para determinar la concentración del mismo en el sobrenadante. No se detectó concentración alguna de fibrinógeno.

En la figura No.16 se muestra que a una concentración final de etanol del 15 % precipitò casi completamente todo el factor VIII pero únicamente el 60 % de la proteína total. Además, aproximadamente el 75 % de la defibrasa originalmente presente, permaneció en el sobrenadante. El precipitado puede ser fácilmente disuelto en solución salina citratada a un volumen de 1/100 de aquel del plasma inicial. Su actividad específica está en el rango de 2,530 a 6,250 U/g de proteína, lo que representa aproximadamente una purificación con respecto al plasma de 200 a 400 veces. Este concentrado fue estable cuando almacenado por 48 horas a temperatura ambiente, por una semana a 4°C y por al menos tres meses a - 25°C .

El concentrado obtenido después de la etapa de precipitación en frío con etanol y posterior purificación por cromatografía en columna de Sephadex., resultó con una purificación de 3,000 a 8,000 veces con respecto al plasma, estable por 2 días a 4°C y por al menos 3 meses a - 25°C .

4.-DISCUSION

Los resultados del presente estudio muestran que la defibrasa cuando - probada a un más amplio rango de concentración, no afecta la actividad ni destruye el factor VIII en el plasma.

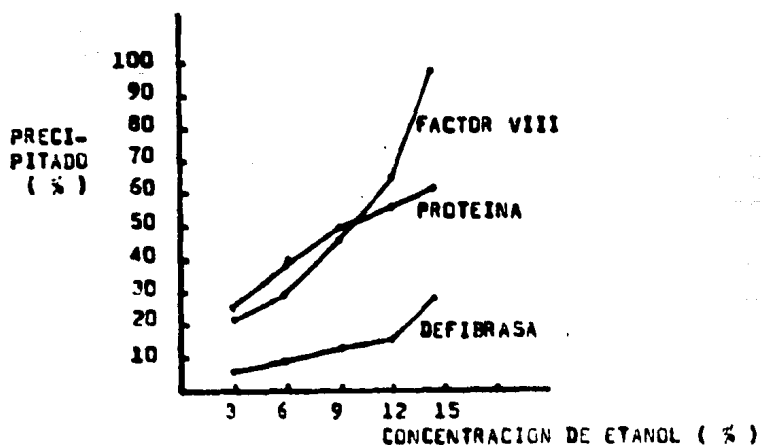
Además, la defibrasa usada en concentrados de factor VIII de baja pureza, tales como crioprecipitados y dextran-precipitados, remueve el fibrinógeno sin ninguna aparente reducción en la actividad.

Tabla No.16.- Actividad del Factor VIII en el plasma tratado con Defibrasa e incubado a 37°C .

CONCENTRACION FINAL DE DEFIBRASA U/ml.	ACTIVIDAD DEL FACTOR VIII DESPUES DE INCUBACION POR:	
	1 HORA (%)	4 HORAS (%)
0.02	97	94
0.04	108	101
0.08	95	82
0.20	101	96
PLASMA CONTROL	100	100

Nota: Sistema de incubación: 1.8 ml. de plasma más 0.2 ml. de buffer veronal o solución de Defibrasa en buffer. La actividad del factor VIII fue expresada como un porcentaje de la actividad del plasma control el cual se incubó por el mismo tiempo.

Figura No.16.- Efectos de la variación de la concentración de etanol sobre la precipitación del Factor VIII, proteína total y defibrasa de una fracción libre de fibrinógeno (pH 6.8, 2 horas, - 2°C).



B - 4

PREPARACION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO A PARTIR DE PLASMA NO FRESCO

M. WICKERHAUSER (1976)

PREPARACION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO A PARTIR DE PLASMA

NO FRESCO

1. INTRODUCCION

El plasma fresco es separado y congelado pocas horas después de su recolección. Esto es indudablemente el mejor comienzo para la recuperación del factor antihemofílico. No obstante, los problemas de la separación del plasma inmediatamente después de la donación son grandes, debido a la gran cantidad de sangre que manejan la mayoría de los Bancos de Sangre.

Se reporta que en promedio, el 60% de la actividad original del factor VIII queda en el plasma de sangre la cual ha sido almacenada arriba de 21 días en el frío. En otros estudios se muestra que el crioprecipitado preparado de igual forma sobre plasma viejo todavía contiene aproximadamente 30% de la actividad original del factor VIII. Se ha encontrado (Burka y cols., 1973) que hay una pequeña hemólisis en la sangre almacenada por más de 6 días y que un aumento significativo de hemoglobina libre está presente en el plasma de sangre almacenada por más de 14 días.

Un reciente registro de Red Cross Blood Centers, muestra que aproximadamente el 25% de todo el plasma es separado dentro de los 6 días siguientes a su recolección.

Experimentos preliminares a pequeña escala muestran que tal plasma puede ser usado para obtener un intermediario puro de AHF por aplicación del método descrito por James y Wickerhauser, Figura No. 17 y Tabla No. 17. En estos estudios solo plasma proveniente de sangre almacenada de 4 a 6 días fue usado. El plasma de 1 a 3 días de viejo fue intencionalmente excluido, con la suposición de que éste pudiera dar igual o mejores resultados.

2. MATERIALES Y METODO

Comenzando, el material utilizado en estos estudios fue plasma derivado de sangre de 4 a 6 días de viejo, recolectada de donadores voluntarios a los cuales se les efectuó radioinmunoensayo para detectar el antígeno B de la hepatitis. El plasma fue congelado en bolsas dentro de las 4 horas siguientes a la remoción de las células rojas y después almacenado a menos de -20°C por períodos de 1 a 3 meses antes de su uso.

El plasma de este modo obtenido podrá ser llamado no fresco, en este---
 texto, para distinguirlo del plasma fresco congelado derivado de sangre
 fresca, el cual es el material normalmente usado para recuperar el AHF.

a) REACTIVOS

Buffer para extracción:	tris hydroximetilaminometano (THAM) 0.02 M-- preparado con 2.42 g de THAM en un litro de agua destilada y ajustado el pH a 7.0 con -- HCl concentrado.
Hidróxido de aluminio:	Al (OH) ₃ al 3% y estéril.
Ajustes de pH:	HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N.
Citrato de sodio:	citrato de sodio 0.5 M.
Polietilén glicol:	polietilén glicol con peso molecular de 4000
Control de AHF:	AHF concentrado, preparado por E.R. Squibb - and Sons a partir de plasma fresco congelado lotes No. 1250 y 1251.
Actividad de AHF:	fue determinada por la prueba de generación- de tromboplastina (Pool y Robinson, 1959), - figura No.18.

La potencia del factor VIII fue expresada en unidades equivalentes a
 un mililitro de plasma fresco. El grado de purificación fue definido co
 mo el incremento en la actividad específica (unidades/mg de proteína)-
 en el que el plasma fresco contiene 62 mg. de proteína por ml.

b) PREPARACION DEL AHF

fue usado el método descrito por James y Wickerhauser, para producir un intermediario puro de AHF a partir de plasma fresco congelado, Figura No.17 y Tabla No. 17. Durante la etapa de extracción del crioprecipitado se efectuaron las menores variaciones para mejorar la concentración o solubilidad del producto final.

Cuatro lotes a gran escala fueron preparados usando de 112 a 137 litros de plasma por lote, de un total de 473 litros de 2095 paquetes de plasma no fresco.

Para cada lote de AHF, aproximadamente 500 unidades de donaciones de plasma congelado, fueron parcialmente descongelados por 16 horas a 5°C, estando en un tanque enchaquetado al cual se le circuló agua a 30°C. La temperatura de descongelamiento del plasma en los tanques fue mantenida entre 1 y 2°C. Las muestras fueron tomadas en este punto para su análisis. El crioprecipitado con su sobrenadante fue centrifugado a 1°C y a una velocidad de flujo de 50 litros por hora en una centrifuga Sharples refrigerada. El crioprecipitado recolectado por la centrifuga (10-12 g -- por litro de plasma) fue cuidadosamente lavado con agua fría libre de pirogenos y extraído con buffer tris (pH 7.0) 0.02 M precalentado. El volumen de buffer tris fue entre 2 y 3 ml/g de crioprecipitado. La extracción fue realizada en 30 min. con agitación a 20, 22 ó 24°C. El extracto fue filtrado a través de tela de nylon y el pH fue ajustado a 7.0. La protrombina fue removida de la solución por adición de 3.75 ml de gel de hidróxido de aluminio por litro de plasma, seguida de agitación por 10 min a temperatura ambiente y después centrifugada en una centrifuga Sharples. El $Al(OH)_3$ fue descartado y el sobrenadante fue clarificado al pasar a través de un filtro. El filtrado fue estabilizado por adición de citrato de sodio 0.5 M (40 ml/litro), ajustado el pH a 7.0 y clarificado por filtración nuevamente. La solución estéril fue asepticamente vaciada en viales de 100 ml, llenando a 50 ml y liofilizando para reconstituir a 25 ml. La liofilización fue prolongada por 5 días con temperatura de -30°C por las primeras 8 horas siguiendo con un incremento gradual hasta -30°C dentro de las siguientes 8 horas y manteniendo esta temperatura -- por el resto del proceso de secado. Los viales conteniendo el AHF fueron

tapados al vacío y almacenados a 5°C. Alícuotas fueron tomadas en cada etapa de la purificación para efectuarles el ensayo para factor VIII y otras pruebas. El concentrado de AHF final fue probado por Squibb and Sons de acuerdo a los requerimientos de la BUB (Division of Biological Standards, 1969) para la actividad del factor VIII, por la prueba de generación de tromboplastina (Pool y Robinson, 1959), para esterilidad y pirógenos.

El mejoramiento en la pureza y solubilidad se intentó en dos experimentos a pequeña escala para una posterior purificación del AHF con polietilén glicol (PEG 4000) a temperatura ambiente (22°C). Para cada experimento 6 viales del liofilizado de AHF (lote # 1268) fueron reconstituidos con 50 ml de agua por vial y puestos juntos. El pH de la solución fue ajustado de 7.3 a 6.5 y se le adicionó PEG a una concentración de 4.5% para el primer experimento y 4.0 para el segundo. Después de agitar por 20 min, el precipitado fue obtenido por centrifugación y desechado. La solución sobrenadante fue ajustada a pH 6.05. El PEG fue adicionado a 11% de concentración final y la mezcla fue agitada por 20 min. El AHF fue recuperado por centrifugación y disuelto en buffer tris-citrato (tris 0.02 M más citrato de sodio 0.02 M y pH 7.0) a un volumen final de 18 ml y pH 6.9. En el primer (experimento) experimento, la solución fue esterilizada filtrándola a través de un filtro Millipore y el filtrado (16 ml) fue liofilizado en volúmenes de 5 ml. La solución para el segundo experimento se declaró ser infiltrable.

3. RESULTADOS

Los 4 lotes del concentrado de AHF a gran escala: # 1268, 1269, 1279 y 1296 estuvieron dentro de los requerimientos establecidos por la BUB (Division of Biological Standards, 1969). Los datos sobre el producto y el promedio de purificación se presentan en la tabla No. 18. Después de descongela, el plasma contenía inicialmente de 430 a 530 unidades por litro antes de la remoción del crioprecipitado y de 140 a 300 unidades por litro en el fluido sobrenadante después de su remoción. De 190 a 203 unidades de AHF por litro de plasma fueron recobradas en el extracto crioprecipitado. Después de la adsorción con hidróxido de aluminio y filtración, el producto bajó a 122 - 170 unidades de factor VIII por litro. Durante la liofilización bajó a 104 - 142 unidades de AHF por litro de plasma inicial. La potencia del liofilizado reconstituido en 25 ml, --

por vial, tiene un rango de 5.8 a 7.9 unidades por ml (145 a 198 unidades por vial) estando de 6.7 a 9.6 veces purificado. La potencia reportada -- por E.R. Squibb es de 18 a 46% mayor, esto es, 7.0 a 9.3 unidades por ml (173 a 233 U/vial) correspondiendo a un producto con 120 a 173 unidades por litro de plasma.

Se observó la etapa de extracción con volumen reducido de buffer, esto es 2 ml en lugar de 3 por gramo. Esto afectó en una menor filtrabilidad de la solución de AHF y en una menor solubilidad del producto liofilizado (lote # 1279) requiriendo de 15 a 20 minutos para ser disuelto. Los restantes 3 lotes de AHF se disolvieron entre 8 y 10 minutos, resultados comparables con el AHF control derivado de plasma fresco congelado. La adición de 1 a 2% de glucosa o 1% de glicina antes de la liofilización mejoró la solubilidad del producto. La extracción a temperaturas mayores de 20 °C afectó la filtrabilidad sin mejorar el AHF producido.

La concentración de hemoglobina (expresada como microgramos por ml) -- fue únicamente aproximadamente 50% mayor en el AHF derivado de plasma no fresco, que en el producto obtenido de plasma fresco congelado. Cuando la hemoglobina se expresó en miligramos por unidad de factor VIII, cualquier lote es de 2 a 3 veces mayor, debido a la menor pureza del AHF derivado de plasma no fresco, Tabla No. 19.

Trombina, plasmina y antígeno B de la hepatitis, no fueron detectables en estos productos. El título de la isoaglutinina inmune anti-A fue muy bajo o no detectable. La concentración salina está entre 1:10 y 1:20 y la concentración de antiglobulina entre 1:40 y 1:80 (Tabla No. 20). El contenido de aluminio residual de los cuatro lotes de AHF fue extremadamente bajo, menor de 0.04 mg/ml o menor de 0.01 mg/U de AHF. El nivel de aluminio del plasma control es de 0.03 mg/ml.

Con la ayuda de polietilén glicol a 4.5 y 11%, se obtuvo un producto purificado 32 veces más concentrado y se recuperó un 60% de la actividad, empezando con un concentrado 7 veces purificado, Tabla No. 21. El concentrado liofilizado fue altamente soluble, presumiblemente debido a un nivel bajo de fibrinógeno. El producto reconstituido dio una solución clara dentro de un minuto. Cuando se agregó PEG al 4% en lugar de 4.5%, para precipitar el fibrinógeno contaminante, el AHF recuperado se incrementó en un 78%, pero la solución final fue únicamente 50 veces purificada sobre plasma. La solución fue infiltrable debido a la insuficiente remoción del fibrinógeno.

4. DISCUSION

El método descrito por James y Wickerhauser, para la preparación de un intermediario puro a partir de plasma fresco congelado es también aplicable a plasma menos fresco. La actividad del factor VIII en el tanque de plasma no fresco fue de 0.45 a 0.53 unidades por ml., el cual es únicamente ligeramente menor que el establecido en el plasma fresco congelado; y la recuperación de pasta crioprecipitada (10 a 12 g/litro) -- fue similar para ambos orígenes de plasma. Hay, sin embargo, diferencias distintivas entre los resultados reportados en este estudio y los resultados previos usando plasma fresco congelado. Únicamente del 20 al 25% de la actividad del factor VIII fue recuperada del plasma no fresco comparado con un 40% obtenido del plasma fresco congelado (James y Wickerhauser, 1972). La recuperación de AHF a partir de plasma no fresco -- fue de aproximadamente la mitad de la obtenida de plasma fresco congelado; y el AHF producido fue la mitad de puro, pero aún se encuentra dentro de la potencia y pureza requerida (3 unidades de AHF por ml. y 5 veces purificado) por la BCB (Division of Biologics Standards, 1969). La solubilidad no es diferente entre el AHF derivado de plasma no fresco y del fresco. Los intentos por mejorar el producto o potencia del factor VIII por incrementación de la temperatura de extracción del crioprecipitado (20 °C) o por reducción del volumen de buffer, fueron insuficientes. Las dificultades en la filtración y la difícil solubilidad del liofilizado fueron los resultados. La hemoglobina contenida en el AHF derivado del plasma no fresco es únicamente ligeramente elevada en comparación con el obtenido del plasma fresco congelado. Esto está de acuerdo con Burka y cols., 1973, quien establece que no se eleva significativamente la hemoglobina si el plasma es recuperado dentro de una semana después de que se recolectó la sangre. El almacenaje de la sangre de 4 a 6 días antes de la separación del plasma, aparentemente no causa ninguna activación de la protrombina o plasminógeno.

En comparación con el crioprecipitado de un único donador, el liofilizado del concentrado de AHF preparado a gran escala a partir del plasma no fresco es equivalente en potencia y pureza, pero es obtenido únicamente la mitad del producto. Un concentrado mejorado puede ser esperado si el plasma empieza a ser recuperado dentro de los 4 días siguientes

tes a la recolección de la sangre. El producto liofilizado tiene la ventaja de mejorar la estabilidad y la potencia estandarizada. Si el AHF de este origen de plasma tiene efectividad en pruebas clínicas, la disponibilidad de este producto puede contribuir a aumentar los concentrados de AHF disponibles para el tratamiento de hemofílicos.

En situaciones donde la pureza del concentrado de AHF es más importante que el rendimiento, un preparado purificado y muy soluble podrá ser obtenido por el método aquí descrito con una recuperación de 60 a 85 unidades de factor VIII por litro de plasma.

Figura No.17.-Método de H.L.James y M. Wickerhauser, para la preparación de un concentrado de factor VIII de pureza intermedia.

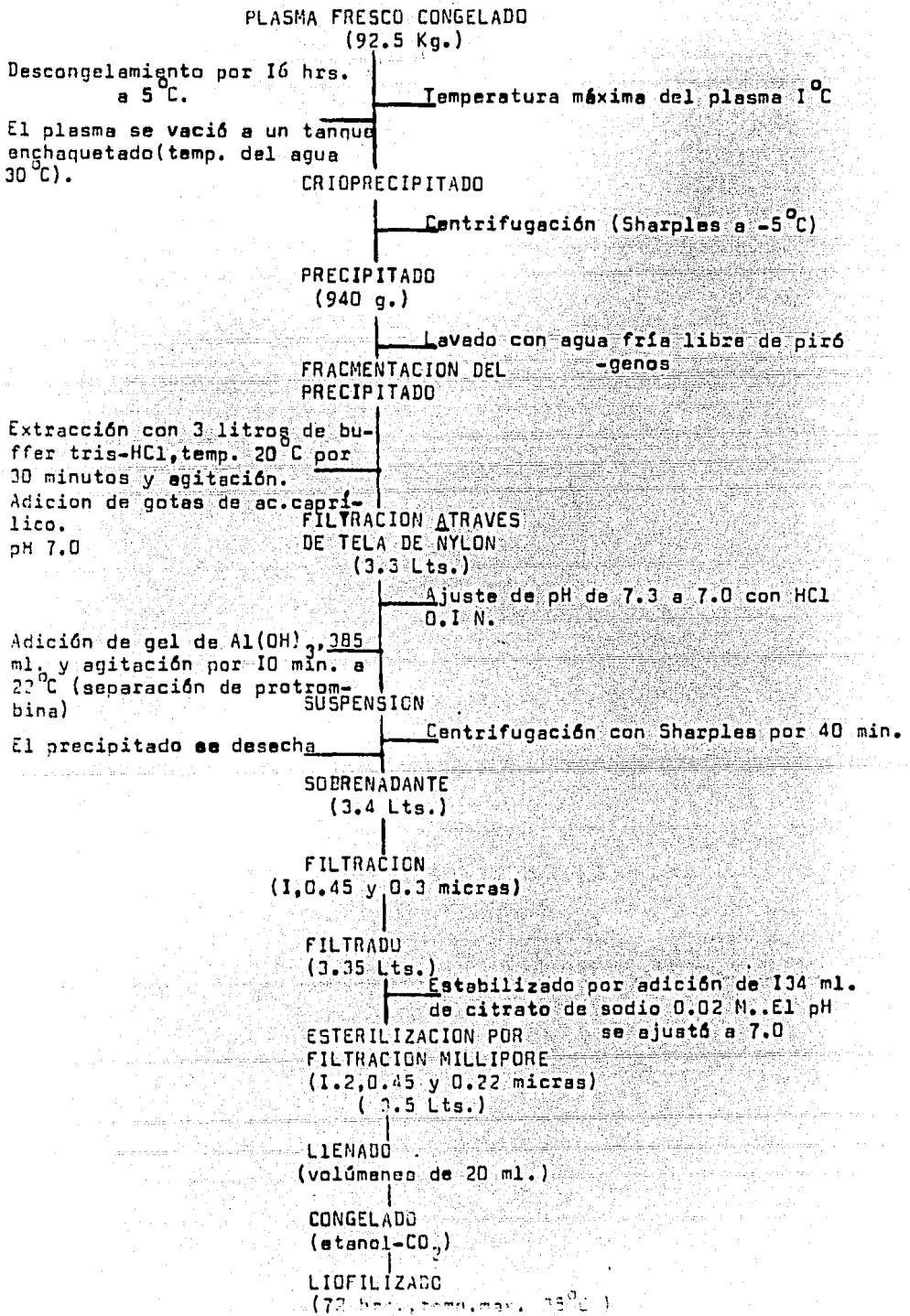


Tabla No 17-Preparación a gran escala de un concentrado de factor VIII (lote No.8) a partir de 90 litros de plasma.

ETAPA	VOLUMEN Lts.	PROTEINA mg/ml.	POTENCIA DEL FAC- TOR VIII U/ml.	ACTIVIDAD ESPECIFI- CA. U/mg. DE PROTEINA	PURIFICA- CION. VECES	RECUPE- RACION %
EXTRACTO TRIS	3.30	3.41	6.0	0.176	II	22.0
CONCENTRADO FINAL:						
ANTES DE LA LIO- FILIZACION.	3.50	1.79	5.8	0.324	20	22.5
DESPUES DE LA LIOFILIZACION. (reconstituido en la mitad de su volumen ori- ginal).	1.78	3.38	10.0	0.296	18	19.8

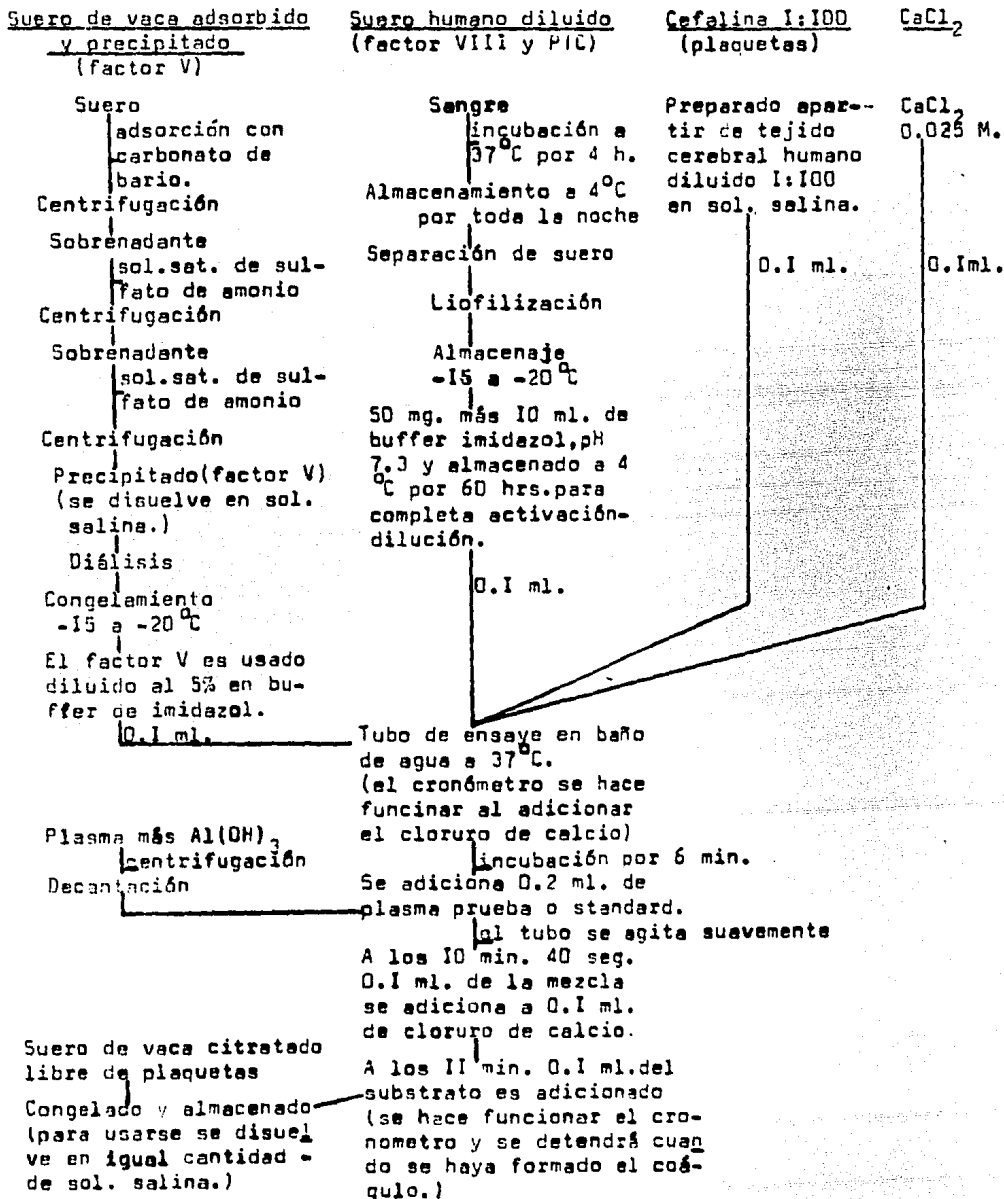


Figura No. 18.-Método de Pool y Robinson, para la determinación de factor VIII (Generación de Tromboplastina).

Tabla No.18.-Preparación de AHF a partir de plasma no fresco(Recuperación y Grado de Purificación)

Etapa	Lote número			
	1268	1269	1279	1296
Plasma inicial,volumen(litros)	137.5	105.3	118.0	112.5
Factor VIII u/litro		450	430	530
Crioprecipitado,gram/litro de plasma	10.3	11.9	10.0	11.0
Sobrenadante,F VIII u/litro	170	140	190	300
Extracción tris				
Volumen de buffer,litros/Kg.crio	3	3	2	3
Extracto,volumen(litros)	4.5	4.0	2.3	3.7
Temperatura de extracción	24 C	20 C	22 C	20 C
Factor VIII u/ml.	6.2	5.0		5.9
Purificación sobre plasma(veces)	10.6	10.6		11.3
Recuperación,F VIII u/litro	203	190		193
Tratamiento con Al(OH) ₃ ,filtrado del concentrado de AHF.				
A. Antes de la liofilización(lts.)	5.2	4.6	3.1	3.8
Factor VIII u/ml.	3.5	3.9	4.7	3.7
Purificación sobre plasma(veces)	8	10.8	8.1	11.3
Recuperación,F VIII u/litro de plasma	132	170	122	138
B. Después de la liofilización, volumen(litros)	2.6	2.3	1.55	1.9
Factor VIII u/ml.	5.8 (7.0)	6.5 (8.1)	7.9 (9.3)	6.3 (9.2)
Purificación sobre plasma(veces)	6.7	9.0	7.5	9.6
Recuperación,F VIII u/litro de plasma.	110 (132)	142 (176)	104 (120)	106 (156)

Tabla No.19.-Concentración de Hemoglobina en concentrados de AHF reconstituidos.

Hemoglobina	Número de lote					
	I268	I269	I279	I296	I250'	I251'
Microgramos/ml.	350	320	310	270	230	250
Microgramos/unidades de factor VIII.	60	50	40	43	24	22

'Muestras control de AHF preparadas a partir de plasma fresco congelado

Tabla No.20.-Concentración de isoaglutininas Anti-A en concentrados reconstituidos de AHF.

Anticuerpos Anti-A	Número de lote			
	I268	I269	I279	I296
Natural (salina)	20	10	20	20
Natural más Inmune (antiglobulina)	80	40	40	80
Inmune (Antiglobulina o muestra neutralizada con sustancia AB)	2	0	0	1

Tabla No.21 -Purificaciones posteriores de un concentrado de AHF por fraccionamiento con polietilen glicol al 4.5 y 11% (rendimiento y grado de purificación)

Etapas de Purificación	Volumen (ml.)	Factor VIII (U/ml.)	Recuperación (%)	Proteína (mg/ml)	Proteína - coagulable (%)	Purificación (veces)
AHF inicial # I268						
Reconstituido 50 ml/vial	300	2.9	100	25.8	68	6.7
Sobrenadante PEG 4.5%	300	1.8	62	3.8		29
Sobrenadante PEG 11%	320	0.25		1.9		
AHF purificado con PEG						
Antes de la liofilización	16	30.8	57			
Después de la " "	16	32.7	60	20.3	28	100

B - 5

METODO DE FRACCIONAMIENTO A GRAN ESCALA

VI. UN METODO MEJORADO DE FABRICACION DE FACTOR ANTITROMBOTICO

K. WICKERHAUSER, J.E. MERCER Y J.W. ECKENRODE (1978)

METODO DE FRACCIONAMIENTO A GRAN ESCALA
VI. UN METODO MEJORADO DE FABRICACION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO

1. RESUMEN

Para incrementar la pureza y potencia del concentrado de factor antihemofílico preparado por el método de James y Wickerhauser(1972), las siguientes modificaciones son introducidas:

- 1).-Una etapa de extracción en frío fue incorporada para remover las impurezas solubles en frío. El crioprecipitado fue extraído con buffer --tris 0.02 M, pH 7.0 (4 ml/g de crio) a 0°C. El factor VIII perdido en esta etapa fue despreciable.
- 2).-El AHF fue recuperado de la porción insoluble en frío por extracción a 21°C con el mismo buffer. Para incrementar la concentración del AHF, esta segunda etapa de extracción fue realizada con pequeños volúmenes de buffer (2 ml en lugar de 3-4 ml/g de crio).

Las etapas subsiguientes, la desprotombinización, filtración y liofilización no fueron alteradas. Para incrementar la concentración del factor VIII, el concentrado seco fue reconstituido del 40 al 50% de su volumen inicial. El concentrado de AHF obtenido por este método a gran escala -- fue de 20 a 30 veces más concentrado y de 40 a 50 veces más purificado con respecto al plasma. Con una recuperación de aproximadamente 250 unidades de factor VIII por litro de plasma. El producto final fue fácilmente soluble, claro y casi incoloro cuando reconstituido.

2. INTRODUCCION

El intermediario puro de factor VIII preparado por el método de James y Wickerhauser(1972), contiene aproximadamente 10 unidades por ml y está de 20 a 25 veces purificado con respecto al plasma.

El método está basado en la extracción de una fracción, que contiene el factor VIII, por crioprecipitación seguida de una purificación per--- cial con hidróxido de aluminio.

Al intentar mejorar la potencia del concentrado de factor VIII por -- reducción del volumen de buffer de extracción se obtiene una solución -- muy difícil de filtrar y un producto liofilizado poco soluble, debido -- esto presumiblemente, al alto contenido de fibrinógeno y otras proteínas.

Los concentrados terapéuticos de AHF con alta pureza y potencia, han sido preparados por métodos de precipitación usando ácido técnico o polietilen glicol (PEG-4000) (Sgouris y Wickerhauser, 1973 y Newman y cols., 1971), Figura No. 27. La desventaja de estos métodos es la toxicidad potencial del ácido técnico o una baja recuperación de factor VIII como se experimenta con el método de PEG. La purificación del AHF por adsorción del fibrinógeno contaminante con kaolin y bentonita o tierra galactita han sido descritos, pero estos métodos no son reproducibles debido a la variación en la velocidad de adsorción (a gran escala). El lavado del crío a -5°C con 8% de etanol para remover las proteínas ocultas incrementa la pureza del AHF en un rango de 18 a 22% (Newman y cols., 1971), un riesgo del crío con agua fría es realizado con el mismo propósito.

Los investigadores decidieron evaluar la técnica de extracción fraccionada reemplazando el lavado, que tiene como propósito aumentar la cantidad de proteínas impuras removidas del crío. El principio de extracción fraccionada ha sido aplicado para el fraccionamiento del plasma en el método 10 de Cohn y cols., (1950), Figura No. 20 y Tabla No. 29 y para la purificación de fibrinógeno, ambos procesos están basados en el uso de etanol.

Este documento describe como la extracción fraccionada del crío, usando la temperatura como parámetro principal, puede ayudar a incrementar la pureza y potencia de el concentrado de AHF sin adicionar algún nuevo reactivo al sistema.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

a).-El plasma fresco congelado CPD usado en estos estudios fue derivado de donadores voluntarios, probados previamente para hepatitis. El plasma fue separado de las células rojas y congelado en bolsas (200 a 250 ml por unidad de sangre) dentro de las 6 horas siguientes a la recolección de sangre. El plasma fue almacenado a temperatura menor de -20°C por períodos de 3 meses antes de su uso.

b).-Buffer tris-HCl, 0.02 M, fue preparado por disolución de 2.42 g de tris(hidroximetil-aminometano) en un litro de agua destilada libre de pirógenos y ajustado el pH a 7.0 con HCl concentrado.

c).-Hidróxido de aluminio, suspensión estéril al 3%.

d).- Los ajustes de pH fueron efectuados con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

e).-Citrato de sodio.

f).-Buffer imidazol pH 7.2, fue preparado por disolución de 1.72 g de --imidazol en 90 ml. de HCl 0.1 N, ajustado el pH a 7.2 y aforado con agua destilada a 100 ml.

TECNICAS

a).-La actividad del factor VIII fue determinada por un ensayo modificado del Tiempo de Tromboplastina Parcial PIT (Proctor y Rapaport, 1961).

b).- Etapa de descongelamiento del plasma y crioprecipitación. Fue llevada a cabo como se describe previamente (James y Wickerhauser, 1972), - Figura No. 17. Las bolsas de plástico con el plasma congelado fueron transferidas de -20°C a más 4°C para un parcial descongelamiento. En la planta piloto y a escala en producción se utilizan aproximadamente 500 y 1500 bolsas de plasma o 100 y 300 lt. respectivamente. Parcialmente descongelado fue primero cortado en una cortadora de carne Habart modelo UCM-40 para incrementar el área expuesta y acelerar el descongelamiento, el cual fue entonces completado en un tanque con doble chaqueta y agitación constante, manteniendo el plasma a 0°C . El crio formado fue recuperado usando centrifugas Sharples de $0-1^{\circ}\text{C}$ y con una velocidad de flujo de 40 a 50 lt por hora.

c).- Primera etapa de extracción del crio. Fue llevada a cabo a 0°C para reducir la solubilidad del AHF permitiendo la extracción de más proteína soluble. El crio inicial fue obtenido por centrifugación en Sharples de un tanque de plasma. En el experimento a pequeña escala, el --- crio fue obtenido por agitación por 20 minutos con un vibromezclador. - El extracto fue separado de las proteínas insolubles por centrifugación a 0°C por 20 minutos en una centrifuge Sorvall modelo RC2B. En el experimento a gran escala el crio fue cortado en una cortadora Modart modelo 8141 y extraído por agitación entre los 12 y 16 minutos a 0°C . Un --vibromezclador modelo E-1 fue usado para el experimento a escala piloto (lotes de 100 lt) y el modelo E-2 para escala en producción (lotes de - 300 lt). La solución turbia fue dejada en reposo de 10 a 15 minutos y - entonces la fracción insoluble fue recobrada por decantación haciendo - pasar el sobrenadante por una gasa.

d).- La segunda etapa de extracción del crio fue llevada a cabo entre 10 y 22°C para facilitar la extracción del AHF. El crio derivado de la primera etapa fue extraído por el vibromezclador por 30 minutos usando 2 ml de solvente por gramo de crio original, obteniendose una solución concentrada de AHF. El tipo de solvente usado fue el mismo que en la -- etapa uno (H_2O destilada y buffer tris-HCl). Las subsiguientes etapas -

en la preparación del concentrado de AHF fueron: 1).- Remoción del complejo de protrombina por adsorción con $Al(OH)_3$, usando 0.43 ml de gel por gramo de crio y separación del crioprecipitado por centrifugación en una centrifuga Sharples. 2).- Clarificación através de una membrana Millipore 1.2 micras. 3).- Filtración estéril através de membrana 0.22-micras. La solución final de AHF fue vaciada en volúmenes de 25 ml (en frascos de 50 ml), congelada en nitrógeno líquido y liofilizada por 4 días a temperatura media inicial de $10^{\circ}C$ y posterior incremento hasta $30^{\circ}C$. Logrando un concentrado de producto seco el cual fue reconstituido con 10 ml de agua destilada.

4. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

a) ESTANDARIZACION DE LA REFERENCIA DE AHF DE LA CASA.

El plasma referencia de AHF (lote No. 1) contiene 0.95 unidades de factor VIII por ml, la desviación estandar es de 0.135 y el rango de 0.6-1.0, calculado por 6 ensayos usando un fibrómetro; utilizando el estandar H.O.B. (lote No.4, 1.2 unidades de factor VIII por ml) como una referencia. Valores muy parecidos (0.86 unidades de Factor VIII por ml) fueron obtenidos con un coagulizador, calculado a partir de un ensayo simple en el cual 3 viales de plasma referencia fueron probados contra 3 viales del B.U.B. estandar. El segundo AHF estandar internacional (1.1 unidades de factor VIII por ml) fue proporcionado por el Instituto Nacional de Controles y Estandares Biológicos, Hamstead, Londres. Cuando efectuada otra prueba sobre el coagulizador contra este estandar internacional, una potencia de 0.79 unidades por ml fueron obtenidas para el estandar (lote No.1). En el mismo ensayo la referencia B.O.B. (lote No.4) mostró un valor de 1.2 unidades por ml.

b) EXPERIMENTO PRELIMINAR.

Un experimento preliminar fue llevado a cabo por una simple etapa de extracción (James y Wickerhauser, 1972), Figura No. 17, con el propósito de comparación y determinar el efecto de la etapa de adsorción con cantidades incrementadas de gel de hidróxido de aluminio sobre el rendimiento y la pureza del producto final. Una cantidad de 450 g de crio, recuperado por centrifugación con Sharples, da un rendimiento de 7.0 g por litro de plasma inicial, este fue extraído con buffer tris-HCl (2ml/g de crio), produciendo 1330 ml de extracto. El extracto de AHF fue muestreado y dividido en tres partes, cada una de 593 ml y ---

separadamente tratadas con gel de $Al(OH)_3$ a 0.43, 0.65 y 0.86 ml de gel/g de crio. La remoción del precipitado de hidróxido de aluminio por centrifugación, la filtración, la estabilización con citrato de sodio y el liofilizado fueron efectuados como se describe en (James y Wickerhauser, 1972), Figura No. 17.

Los resultados están resumidos en la Tabla No. 22. Se observó que la adsorción del extracto de AHF con cantidades incrementadas de hidróxido de aluminio, normalmente 0.65 o 0.86 ml por g de crio, da como resultado una disminución de la actividad del factor VIII sin una reducción significativa de la proteína coagulable o mejoramiento en la actividad específica. La liofilización no causa ninguna pérdida en la actividad del factor VIII. Después de la diálisis, para remover el citrato, los 3 concentrados coagularon entre 20 y 30 minutos cuando fueron incubados a temperatura ambiente con la mezcla de activación protrombínica.

c) EXTRACCION DEL CRIO EN FRIO

Este experimento fue hecho para determinar el grado de solubilización del AHF y otras proteínas plasmáticas a $0^{\circ}C$. Agua destilada y buffer tris-HCl fueron usados como solventes (Hershgold y cols., 1966 y James y Wickerhauser, 1972), Figuras No. 28 y 17. Alícuotas de 20 y 50 g de crio fueron extraídas con 200 ml del solvente representando la proporción de 10 y 4 ml por gramo de crio. Los resultados resumidos en la Tabla No. 23 muestra que la cantidad de proteína extraída y la actividad del AHF fueron independientes del volumen del solvente, pero que el buffer tris-HCl extrajo únicamente 1.5 unidades de factor VIII y 30 mg de proteína por g de crio comparado con aproximadamente 7 unidades y de 35 a 40 mg de proteína extraída por agua destilada. Basándose sobre la recuperación de 9.4 g de crio por litro de plasma inicial, esto corresponde aproximadamente a 14 unidades de factor VIII y 270 mg de proteína extraída por litro de plasma con buffer tris-HCl, la extracción con agua da de 60 a 70 unidades y 350 mg de proteína. Aproximadamente la mitad de la proteína extraída fue fibrinógeno. Para este experimento parece que el agua libre de sales es inapropiada para la extracción selectiva de impurezas del crio, debido al alto grado de solubilización del AHF durante la etapa de extracción en frío.

d) EXPERIMENTO A ESCALA PILOTO

Una segunda etapa del proceso de extracción fue evaluada sobre 4 lotes de 100 lts de plasma usando buffer tris-HCl. Tres lotes fueron preparados por el método de extracción en dos etapas, Figura No. 19. A uno de estos lotes se le adicionó citrato 1 mM al buffer de extracción para minimizar la disminución de este anticoagulante, causada por la introducción de una etapa de extracción fría para determinar el efecto sobre el rendimiento y estabilidad del producto final. Un cuarto lote fue preparado omitiendo la etapa de extracción en frío, sirviendo como un control. El volumen de plasma inicial está en el rango de 99 a 109 litros, promedio 104; la recuperación del crío fue de 8.2 a 9.2 g, promedio 8.7 por litro; el plasma tiene una potencia de 620 a 670 unidades, promedio 643 por litro y la pérdida en el sobrenadante del crío fue de 160 a 200 unidades, promedio 176 por litro. Los datos de la recuperación y purificación se presentan en la Tabla No. 24. La cual muestra que en tres lotes preparados por el procedimiento de extracción en dos etapas (lotes 21, 22 y 23) la pérdida en la etapa de extracción en frío fue considerablemente pequeña, de 4 a 7 unidades por litro de plasma, los concentrados finales fueron obtenidos con un rendimiento de 225 a 247 unidades por litro y de 40 a 45 veces purificado sobre el plasma. El lote control No. 9 fue obtenido con un rendimiento comparable, pero la purificación fue únicamente de 25 veces sobre el plasma. Los tres concentrados fueron preparados sin problemas de filtración y los productos liofilizados disolvieron dentro de los 5 minutos. El lote control, no obstante tuvo dificultad al filtrar y perdió solubilidad debido probablemente al alto contenido de fibrinógeno. Además el producto reconstituido estaba turbio y amarillento.

Todos los concentrados fueron ligeramente hipotónicos, su conductividad fue de 12.0 a 12.5 mmho y su osmolaridad de 257 a 267 mosm, comparado con 14.6 mmho y 280 mosm de una solución salina fisiológica (0.15 M de NaCl). La determinación del citrato contenido reveló una disminución de éste después de la segunda etapa de extracción, Tabla No. 25. El contenido de citrato fue de 2.4 a 3.0 comparado con 5.6 mM de la muestra control preparada por el método de extracción en una etapa (James y Wickerhauser, 1972), Figura No. 17. El lote No. 22 preparado por el uso de tris-HCl contiene 4.2 mM de citrato. El producto final tuvo de 60

a 65 mM de citrato, correspondiendo de 23 a 25 mM antes de la liofilización. La concentración del citrato fue dejada a 20 mM, el resto fue extraído del crio. La disminución del citrato no causó efectos adversos sobre la estabilidad de las muestras reconstituidas de AHF, quedando aproximadamente el 90% de la potencia después de 24 horas a temperatura ambiente en ambos tipos de concentrados, Tabla No. 26 ; estos resultados son comparables con los de los preparados de AHF en los que se utilizó sólo una etapa de extracción, Tabla No. 22 .

Los detalles analíticos de uno de estos lotes se muestra en la Tabla No. 27. La etapa de extracción en frío remueve únicamente 124 mg de protg fina y 5.6 unidades de factor VIII por litro de plasma, esto es menor de la mitad de lo que se obtuvo en el experimento a pequeña escala. Esta extracción fue efectuada bajo condiciones leves para evitar el desarrollo de dificultades durante la separación por decantación. No obstante las condiciones suaves de la extracción en frío, el concentrado de AHF final fue 40 veces purificado sobre plasma. La recuperación fue de 230 unidades de factor antihemofílico por litro o 38% de la actividad inicial del plasma. El concentrado final liofilizado se disolvió dentro de los 5 minutos a temperatura ambiente, tuvo una potencia de 24.3 unidades por ml y la solución fue clara e incolora.

e) COMPARACION ENTRE FIBROMETRO Y COAGULIZADOR PARA LA DETERMINACION DEL FACTOR VIII

Los valores del factor antihemofílico mostrados en este experimento fueron obtenidos por un fibrómetro o un coagulizador. El coagulizador -- provee resultados más rápidos, requiere menos atención y minimiza los -- cambios por error humano. Para comparar los resultados, se ensayaron en -- el coagulizador cada una de las 5 etapas de purificación de los lotes -- 21, 22 y 23, los cuales fueron previamente probados con un fibrómetro. Una buena correlación entre los dos sistemas se observó en los ensayos del plasma rico en crio, extracto crudo de AHF y el concentrado de AHF final. El promedio aritmético de 9 pruebas hechas en el coagulizador dan el -- 93% de los valores obtenidos en el fibrómetro, la desviación estandar es del 12%, el rango de 81 a 107. Los valores del crioprecipitado y extracto frío fueron susceptiblemente mayores en el coagulizador. Para los criosq brenadantes, el promedio fue de 141%, el rango de 123 a 150% y para los -- extractos fríos de 195%, rango de 183 a 219% de aquellos resultados obte

nidos en el fibrómetro. La razón de tal inexplicable discrepancia en estos dos tipos de muestras (criosobrenadantes y extractos fríos) no fue aparente, excepto que ambos contienen muy baja actividad de factor VIII.

F) EVALUACION DE LA EXTRACCION EN DOS ETAPAS

Un total de 17 lotes fueron procesados, 14 con buffer tris-^(A)HCl y 3 con tris-HCl enriquecido con 1 mM de citrato^(B). No se evaluó aumento en los niveles de citrato para evitar el riesgo de solubilización del hidróxido de aluminio durante la etapa de desprotrombinización, la cual podría incrementar la contaminación del concentrado con aluminio (Newman y cols., 1971), Figure No. 27. La recuperación y los datos de las purificaciones están resumidas en la Tabla No. 28. Los dos grupos A y B están en unidades cerradas, las diferencias están dentro del error experimental. El rendimiento sobre plasma inicial fue de 37.5% para el grupo A y 42% para el B. Cuando reconstituidos a temperatura ambiente, todos los concentrados del grupo A se disolvieron dentro de los primeros 5 minutos, pero los del grupo B, tomaron más tiempo. Cuatro concentrados de AHF del grupo A fueron probados para estabilidad seguidos de su reconstitución. En promedio un 91% de la actividad inicial (rango 87 a 98%) fue mantenida después de 24 horas a temperatura ambiente. Estudios de estabilidad acelerada sobre dos lotes, mostraron que después de 5 meses de almacenaje a 5, 22 y 37°C estos mantuvieron el 97, 95 y 74% de la actividad original.

La recuperación de la actividad in vivo del factor VIII después de una hora de la transfusión fue de 63 a 76%.

El tiempo de vida media (in vivo) de la actividad del factor antihemofílico fue de 8.5 a 9.5 horas.

5. DISCUSION

El método de extracción en dos etapas descrito aquí, fue mejorado con las siguientes consideraciones: a) Logrando incrementar la purificación con mínimas pérdidas de actividad y permitiendo la preparación de un producto más concentrado sin comprometer solubilidad y estabilidad. b) Evitando el uso de precipitantes que podrían desnaturalizar o contaminar al producto. El promedio de recuperación de la actividad del factor VIII por el método de extracción en dos etapas es aproximadamente del 40% de la actividad del plasma inicial. Resultado que es comparable con

la recuperación obtenida en el proceso de extracción en una etapa (James y Wickerhauser, 1972), Figura No. 17. Pero la purificación se ve incrementada de 25 (en el método de extracción en una etapa) a 40-45 veces sobre el plasma en el método descrito aquí.

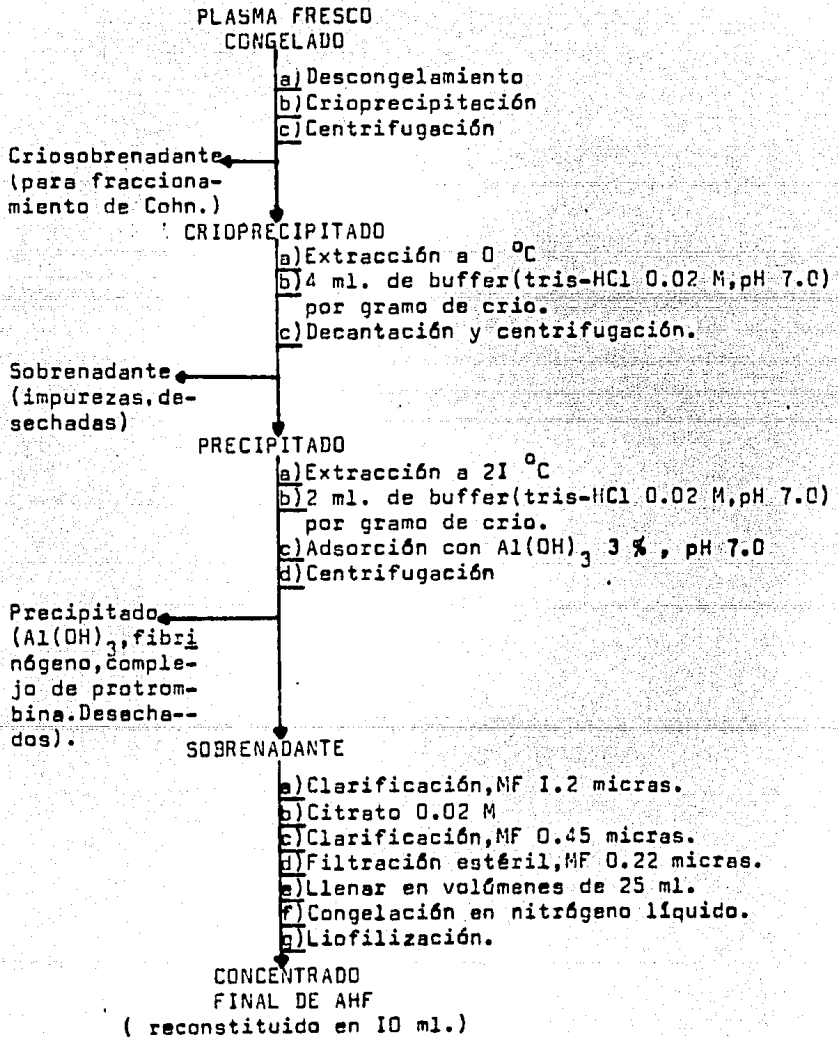


Figura No. 19.-Preparación de AHF por el método de extracción en dos etapas. Método de Wickerhauser, Mercer y Eckenrode.

Note : MF : Millipore filter

Tabla No. 22.-Recuperación y purificación del AHF preparado por el método de extracción en una etapa, con variaciones en las cantidades de $Al(OH)_3$ adsorbente. (el factor VIII fue ensayado en un coagulizador)

	Ext. tris (450 g de crio.)	Adsorción con $Al(OH)_3$, Filtración y Liofilización.		
		ALICUOTA I	ALICUOTA II	ALICUOTA III
Volumen de buffer, ml/g crio	3			
Volumen de extracto, ml.	1830			
Factor VIII, U/ml.	11.2			
Recuperación, Fact. VIII U/g de crio.	46			
Proteína, mg/ml.	42.6			
Proteína coagulable, %	78			
Actividad específica, fac. VIII U/mg de proteína.	0.263			
Purificación sobre plasma, veces.	16			
Gel de $Al(OH)_3$, ml/g de crio		0.43	0.65	0.86
Concentrado de AHF, tratado con $Al(OH)_3$ y filtrado.				
Factor VIII, U/ml		8.9	8.1	7.6
Recuperación del Fact. VIII U/g de crio.		30	29	24
Proteína, mg/ml		25.5	22.0	17.5
Proteína coagulable, %		69	67	65
Actividad específica.		0.35	0.37	0.43
Purificación sobre plasma, veces.		21.6	22.8	26.9
Liofilizado reconstituido en el 40% del volumen original.				
Factor VIII, U/ml. (inicial)		21.7	19.7	18.7
Proteína, mg/ml.		61.3	51.3	41.5
Actividad específica.		0.35	0.38	0.45
Factor VIII, U/ml (después de 24 h. a 21°C).		17.7	20.8	16.1
Factor VIII, U/ml. (porcentaje del inicial)		82	106	86

I Calculado sobre la suposición de que un ml. de plasma fresco contiene I unidad de factor VIII y 62 mg. de proteína.

42.6 mg./ml - 11.2 U

62.0 mg./ml - x= 16.3 U.

Tabla No. 23.-Extracción del crio a 0 °C.(ensayado con fibrómetro)

Expe- rimen to.	Solvente		Extracto				Prot. coagu lable %	Act. esp cifi ca. Fact. VIII U/g crio.	Puri fica ción. sobre plaz ma.
	compo- sición	ml/g crio	Act. de fact.VIII		Prote- ína I.				
			U/ml	U/g crio	mg/ml	mg/g crio			
1	Tris- HCl	4	0.42	1.68	7.2	29	52	0.058	3.6
2	Tris- HCl	10	0.14	1.40	2.8	28	44	0.050	3.1
3	H ₂ O	4	1.78	7.12	9.6	38	54	0.185	11.5
4	H ₂ O	10	0.66	6.6	3.6	36	68	0.183	11.4

Tabla No. 24.-Comparación de los concentrados preparados por los métodos de extracción en una y dos etapas.(ensayado con fibrómetro).

	Buffer de extracción		
	Control (exp.9)	Tris-HCl (exp.21)	Tris-HCl más ci- trato - 1 mM (exp.22)
Primera extracción (en frío)	ninguno		
Factor VIII, U/l de plasma (pérdida)	5.6	7.0	4.5
Actividad específica, U/mg de prote- ína.	0.045	0.05	0.04
Purificación sobre plasma	2.8	4.1	2.5
Segunda extracción, adsorción con Al(OH) ₃ , filtrado y liofilizado - en 25 ml.(producto final) reconsti- tuido en 10 ml.			
Factor VIII, U/ml.	22.6	23.4	25.2
Proteína total, mg/ml.	56.0	34.2	39.0
Proteína coagulable, mg/ml.	39.8	18.8	26.5
Actividad específica	0.40	0.68	0.65
Purificación sobre plasma, veces.	25	42	40
Recuperación, factor VIII, U/l de plasma.	234	228	247
			225

Tabla No. 25.-Distribución de el citrato durante la preparación del AHF por el método de extracción en dos etapas.

	Citrato, mmol.			
	Control	exp. 21	exp. 22	exp. 23
Plasma inicial		25.0	24.8	23.1
Sistema de extracción del crío.		Tris- HCl	Tris- HCl citra to mM	Tris- HCl
Primera extracción(en frío)	-	4.4	4.9	4.1
Segunda extracción(AHF)	5.6	3.0	4.2	2.4
AHF liofilizado, reconstituido en 0.4 del volumen.		61.4	64.8	59.0

I Preparado por el método de extracción en una etapa (tabla 12 alícuota I)

Tabla No. 26.-Estabilidad de las soluciones de AHF a temperatura ambiente. (ensayado en coagulizador)

Lot. No.	Sistema de extracción	6 h.			24 h.	
		Inicial U/ml	U/ml	% inicial	U/ml	% inicial
21	Tris-HCl	24.3	21.9	90	22.2	90
22	tris-HCl más citrato I mM	24.2	22.1	91	22.1	91

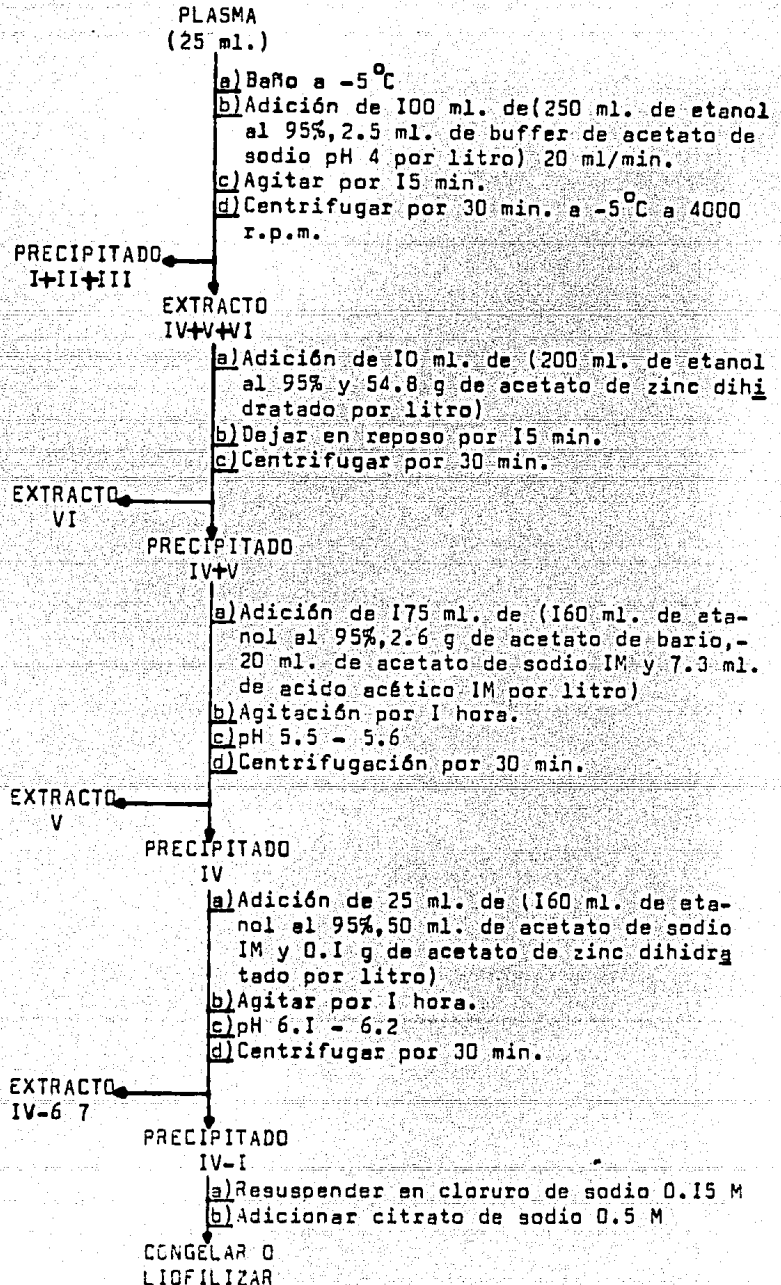
Tabla No. 27.-Purificación y recuperación de los concentrados de AHF preparados por el método de extracción en dos etapas. (lote No. 21).(ensayado en fibrómetro).

Etapa	Volu- men	Factor VIII		Proteína I.		Proteína coagula- ble,%	Actividad especifi- ca.	Purifica- ción so- bre plas- ma.
		U/ml	recupe- ración U/l de plasma	mg/ml	recupe- ración mg/l plasma			
Plasma	99.5	0.62	620					
Criosobrenadante.	98.5	0.26	257					
Ia. ex- tracción (pérdi- da)	3.08	0.18	5.6	4.0	124	29	0.045	2.8
Extrac- ción de AHF	2.7	12.2	331	27.8	615	83	0.535	33.2
Conc. fi- nal an- tes de - liof.	2.34	10.3	242	15.5	364	55	0.665	41.2
Después de liof. y recost. en 0.4 del vol.	0.936	24.3	228	34.2	322	55	0.71	44.0

Tabla No. 28.-Preparación de AHF a gran escala por el método de extracción en dos etapas (lotes de 300 l de plasma, ensayado en coagulizador).

	Buffer de extracción			
	Tris-HCl		Tris-HCl más citrato	
	Promedio	Rango	I mM Promedio	Rango
Recuperación del fact. VIII U/l de plasma.				
Plasma inicial	645	540-740	663	610-700
Criosobrenadante	263	210-327	276	240-310
Primer extracto (frío)	14	7-24	19	9-27
Segundo extracto (AHF)	358	316-416	396	376-419
Conc. de AHF liofilizado				
Recuperación del fact. VIII, U/l de plasma	242	201-280	279	245-309
Potencia del fact. VIII, U/ml.	23.0	19.3-29.5	28.3	24.5-30.8
Purificación sobre plasma, veces.	43	39-53	42	39-46

Figura No. 20.-Método de Cohn para la separación de componentes plasmáticos por Precipitación y Extracción Fraccionada.



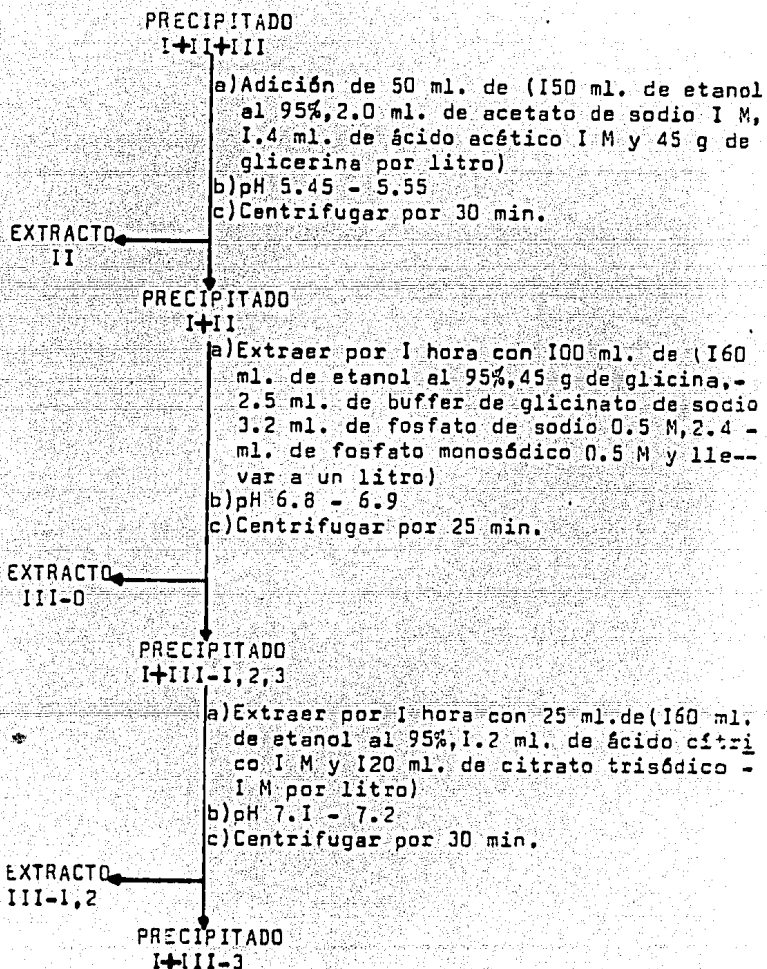


Tabla No. 29.-En esta tabla se presenta la composición de los diferentes precipitados y extractos involucrados en el método de -- Cohn.

FRACCIONES	COMPONENTES		
I+II+III	Gamma globulinas Beta I-lipoproteínas. Beta I-lípidos - pobres de euglobulinas.	Ceruloplasmina Isoaglutininas Plasminógeno Globulinas insolubles en -- frío.	Fibrinógeno Protrombina
IV+V+VI	Seroalbúminas Beta I-proteínas combinadas con - metal. Alfa 2-glicoproteínas.	Alfa 2-mucoproteínas. Alfa I-lipoproteínas. Iodoproteínas Acido Úrico	Colinesterasa Fosfatasa Alfa I-proteínas ácidas pequeñas. Alfa 2- proteínas Beta I- proteínas
VI	Trazas de IV+V Alfa I-proteínas ácidas pequeñas.	Acido Úrico Alfa 2-proteínas.	Beta I-proteínas Otras pequeñas proteínas y péptidos.
IV+V	IV+V+VI menos VI		
V	Seroalbúminas.		
IV	Beta I-proteínas combinadas con - metal. Alfa 2-glicoproteínas.	Fosfatasa. Alfa 2-mucoproteínas. Alfa I-lipoproteínas.	Iodoproteínas. Colinesterasa.
IV - I	Alfa I-lipoproteínas.		
IV - 6+7	Beta I-proteínas combinadas con - metal.	Alfa I-glicoproteínas.	Alfa 2-mucoproteínas. Colinesterasa.
I+III	I+II+III menos II.		
II	Gamma globulinas.		
III - 0	Beta I-lipoproteínas	Beta I-lípidos pobres en eu-- globulinas.	Ceruloplasmina.
I+III - 1,2,3	I+III menos III-0		
I+III - 3	Plasminógeno.	Globulinas insolubles en -- frío(AHF)	Fibrinógeno.
III - 1,2	Isoaglutininas	Protrombina	

B - 6

PREPARACION DE LAS MAYORES FRACCIONES DEL PLASMA POR POLIELECTROLITOS
EN FASE SOLIDA

JOHNSON AJ, MACDONALD VE, SEMAR M, FIELDS JE, SCHUCK J, LEWIS C, and BRIND J.

(1978)

PREPARACION DE LAS MAYORES FRACCIONES DEL PLASMA POR POLIELECTROLITOS
EN FASE SOLIDA

1.-INTRODUCCION

Los polielectrolitos en fase sólida son usados aquí para desarrollar un sistema integrado de métodos flexibles para el fraccionamiento de proteínas plasmáticas. Cada método para el aislamiento y purificación de las fracciones o una modificación de ellos pueden ser usados independientemente o ser adicionado dentro de otro o otros métodos. Cada fracción es preparada siguiendo 3 etapas: adsorción sobre la fase sólida (polielectrolitos), extracción de la fase sólida y concentración por ultrafiltración o por el uso de PEG o ambos. La separación de la fase sólido-líquido es fácilmente llevada a cabo por centrifugación o filtración. El rendimiento y pureza de cada fracción fue de: 1) factores de coagulación II, VII, IX y X 63 % y 200 veces purificado; 2) AHF 43 % y 52 veces purificado; 3) vWF 43% y 71 veces purificado; 4) Fracción de proteína plasmática, como albúmina, 93 % de rendimiento y 92 % de pureza; 5) Albúmina, 92 % de rendimiento y 98.5 % de pureza; 6) Gamma globulina, 92 % de rendimiento y 97.5 % de pureza (Figura No. 21).

La fase sólida descrita en este procedimiento puede adsorber y remover el antígeno de superficie de la hepatitis (HBsAg).

A continuación se discutirá únicamente el método de obtención de factor VIII.

2.-MATERIALES Y METODO

Plasma tratado con ACD (ácido - citrato - dextrosa) o CPD (citrato fosfato - dextrosa) fue mezclado completamente con E - 100 (Copolímeros de etileno/anhídrido maléico sustituido con dimetilaminopropilimida, malla 200, el cual fue lavado 3 veces con NaCl 0.15 M a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml., el pH fue reducido a 4 con ácido cítrico 1.0 N, y el polielectrolito se dejó que se equilibrara al pH de 4 por al menos 5 minutos para completa protonación de la resina, entonces se enjugó al pH deseado con NaOH y se dejó que se equilibrara) 1 mg/ ml. de plasma, pH 8.0 a 4°C o temperatura ambiente por al menos 5 minutos (Figura No. 21). La muestra fue entonces centrifugada o filtrada (Centrifugación a alta velocidad 10,000 X g por 10 minutos o por filtración a través de un filtro de nylon de tamaño de malla 70 micras. Después de la con

trifugación, el sobrenadante fue pasado a través de nylon o de prefiltros Millipore).

El sobrenadante obtenido de la etapa de adsorción con E - 100 se ajustó a pH 6.0, se adicionó E - 5 (Etileno / anhídrido maléico sustituido en un 5 % con dimetilaminopropilimida) 60 mg/ml., se mezcló de 15 a 30 minutos a 4°C o a temperatura ambiente. Después de la centrifugación o filtración de la resina ésta fue lavada 2 veces con NaCl 0.002 M y una vez con NaCl 0.3 M para remover la albúmina y otras proteínas atrapadas, entonces se puso la resina por 30 minutos a pH 7.4 con buffer NaCl 1.5 M - lisina 1.0 M en un volumen igual a aquel del plasma adsorbido original. El sobrenadante fue adsorbido con 0.5 mg/ml. de bentonita para remover aproximadamente el 75 % de el fibrinógeno, posteriormente el sobrenadante se concentró aproximadamente 50 veces por ultrafiltración a través de un cassette Millipore de peso molecular 100,000, el concentrado se diluyó con agua a una concentración final de NaCl de 0.15 M y se reconcentró por precipitación con 20 % (w/v) de PEG a pH 6.0 o por ultrafiltración. El producto final fue usualmente reconstituido en 1/50 de volumen en buffer NaCl 0.15-citrato de sodio 0.01 M a pH 7.0 .

a) METODO ALTERNATIVO

Resina E - 5 (180 mg/ml. de plasma) fue vertida dentro de un embudo büchner con un filtro de nylon de tamaño de malla 70 micras. El plasma -- fue vaciado sobre la resina y se dejó que fluyera libremente a través -- del filtro; la resina fue lavada con 1 volumen (de plasma inicial) de -- solución salina normal y 2/3 de volumen de NaCl 0.15 M - lisina 0.1 M . El AHF fue extraído con dos volúmenes de NaCl 0.6 M - lisina 0.4 M, el ex -- tracto fue ajustado a pH 7.4 . La adición de un buffer de mayor fuerza ió -- nica (NaCl 1.5 M - lisina 1 M²) falló al querer extraer algún adicional AHF de la resina. Con el proceso de filtración en büchner, el cual puede -- ser hecho a gran escala e incorporado a un proceso de flujo continuo, re -- quirió 3 veces más resina y su máxima extracción fue lograda únicamente con buffer NaCl 0.6 M - lisina 0.4 M . Los factores residuales (II, VII, -- IX y X) fueron adsorbidos del concentrado de AHF con 4 mg/ml. de hidró -- xido de aluminio. El AHF fue obtenido y concentrado posteriormente.

²Valores superiores

2.-RESULTADOS

Aunque el peso molecular y el punto isoeléctrico del AHF son desconocidos, esta proteína fue adsorbida por resina de alta y baja densidad de carga con relativa facilidad. La capacidad de adsorción de AHF por la resina parece variar con la densidad de carga (Figura No. 22). Sin embargo, la extracción del AHF de la resina fue difícil, requiriendo grandes cantidades de sal (Figura No. 23) y una resina de baja densidad de carga (Figura No. 22), presumiblemente para reducir el número de enlaces entre sí y el AHF de alto peso molecular.

Aproximadamente 80 mg/ml. de resina E - 5 son necesarios para una adsorción y extracción óptimas del AHF (Figura No. 24). Se obtiene un mayor rendimiento con 15 a 30 minutos de adsorción (Figura No. 25) a pH 6.0 y la extracción óptima a pH 7.4 o 5.7 . Ya que el AHF es muy lábil a pH 5.5 , se escogió usualmente el pH mayor.

Después de que el AHF fue adsorbido sobre E - 5 el pH se aumentó a un rango donde la resina estaba prácticamente sin carga (8.6 a 9.0), la extracción era en realidad baja antes de que se mejorara cambiando el pH (Figura No. 26). El hecho de que el AHF estuviera todavía firmemente unido a la resina sin carga, sugiere la posibilidad de que el AHF fue inicialmente adsorbido por enlaces electrostáticos pero fue retenido por enlaces hidrofóbicos. Esto fue comprobado por el mejorado efecto de los solventes orgánicos o detergentes sobre la extracción del AHF (Tabla No. 30)

Como se indicó anteriormente, el AHF fue adsorbido sobre la resina y muchas otras proteínas (entre ellas el VWF) se quedaron en sobrenadante.

El uso de lisina mejoró sustancialmente la estabilidad del AHF (Tabla No. 31).

Cuando los concentrados de AHF fueron preparados con resina E - 5 aproximadamente el 80 % del AHF fue adsorbido y aprox. el 43 % del hipotético (1 U/ml. de plasma) fue extraído. Este material estuvo 50 veces purificado.

3.-DISCUSION

Los polielectrolitos en fase sólida de etileno/anhidrido maléico han sido empleados en un sistema integrado para el fraccionamiento de plasma. El procedimiento aquí descrito puede ser aplicado a cualquier escala, ya que la separación de la fase sólido - líquido es fácilmente lograda. Esta

fracción es aislada y purificada por adsorción sobre la resina, extraída y concentrada por técnicas de precipitación diferencial o por ultrafiltración.

La adsorción de las proteínas sobre los polielectrolitos y la extracción de las mismas parece ser debido primariamente en hacer y romper enlaces electrostáticos. La adsorción ocurre fácilmente entre las resinas cargadas positivamente y las proteínas cargadas negativamente. La extracción es mejorada cuando la carga diferencial es disminuida al llevar el pH de la mezcla cerca del punto isoeléctrico de la proteína o el pK de la resina, o por adición de NaCl o otra sal.

El AHF es fácilmente adsorbido por las resinas pero es difícil su extracción. Ya que el AHF probablemente tiene un punto isoeléctrico bajo de pH 5.8, el más bajo nivel de estabilidad razonable. En cualquier caso, la extracción del AHF se hace con o sin sal a pH entre 8.5 a 9.0 donde el AHF es razonablemente estable y la resina no está muy cargada.

Ya que la cantidad de AHF adsorbido sobre la resina se incrementa con la densidad de la carga y la cantidad del AHF extraído en realidad disminuye con la reducción de la carga de la resina o con un incremento en la concentración de sal (de 1.5 M a 3.0 M de NaCl), y los solventes orgánicos y detergentes incrementaron el rendimiento, se concluye que el AHF fue atraído por la resina primariamente a través de los enlaces electrostáticos, pero aquellos enlaces hidrofóbicos tuvieron que ser rotos además de los electrostáticos para llevar a cabo la extracción.

El papel de la lisina en la ayuda para estabilizar el AHF in vitro no está aún entendido, no obstante, los experimentos han mostrado que este aminoácido como otros que poseen un grupo amino libre ayudan a prevenir la desnaturalización del AHF.

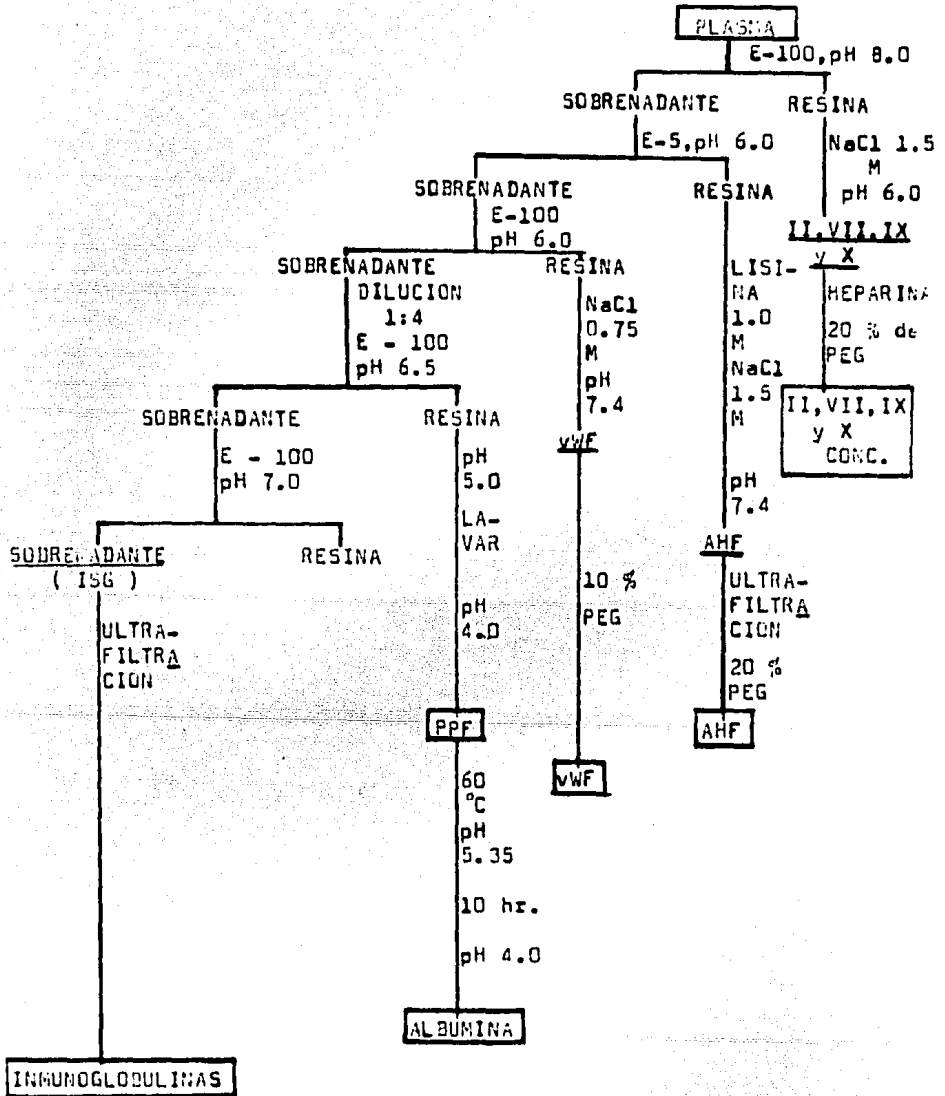


Figura No.21.-Esquema para el fraccionamiento de plasma humano con polielectrolitos en fase sólida (Johnson y cols.,1978)

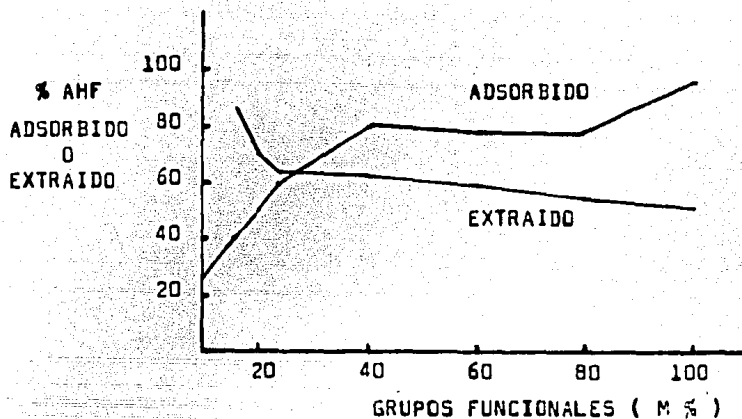


Figura No.22.-Efectos de la densidad de carga de las resinas sobre la adsorción y extracción del AHF de plasma humano.

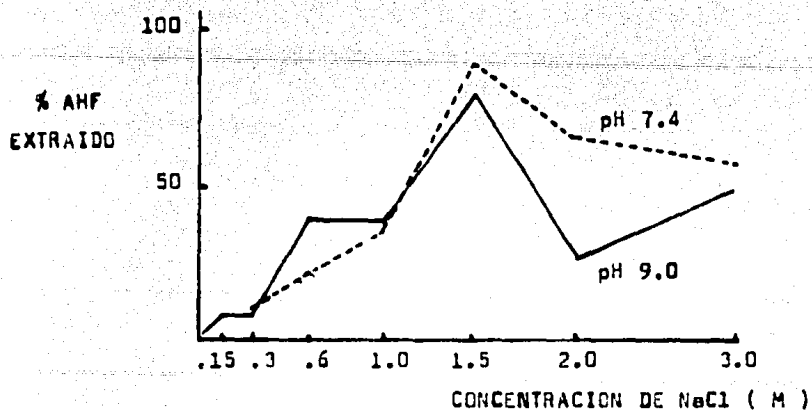


Figura No.23.-Efectos de la variación de la concentración de NaCl a alto pH sobre la extracción del AHF de la resina E - 5 .

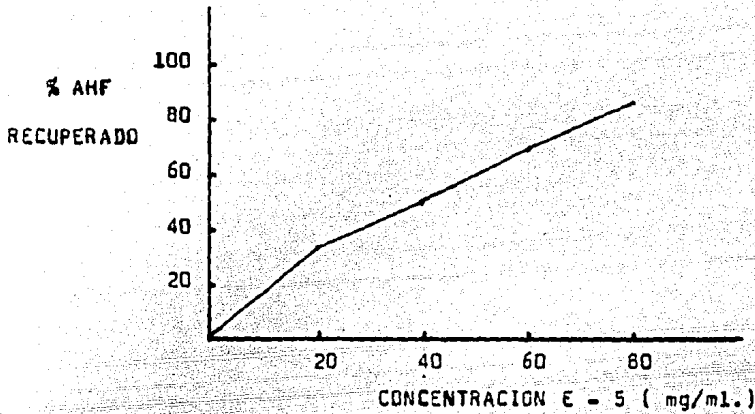


Figura No.24.-Efectos de la concentración de resina E - 5 sobre la adsorción del AHF del plasma y la extracción de la misma.

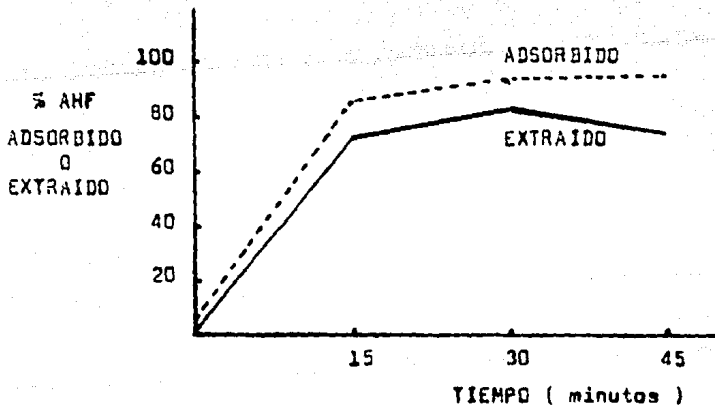


Figura No.25.-Efectos del tiempo de mezclado sobre la adsorción del AHF del plasma y su extracción de la resina -- E - 5 .

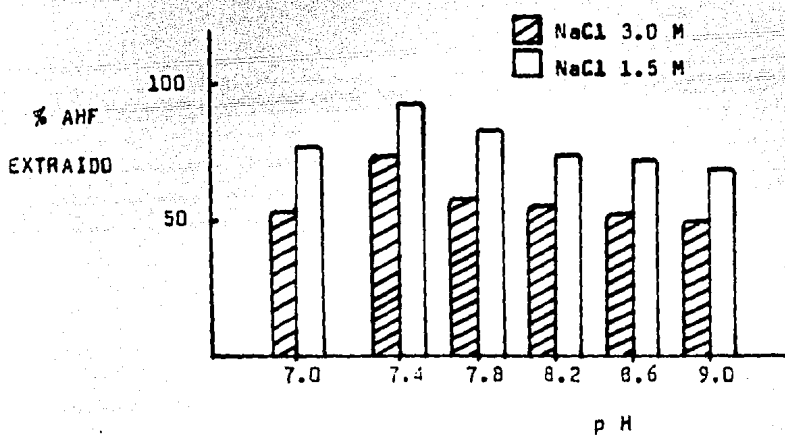


Figura No.26.-Efectos del pH sobre la extracción de AHF de la resina E - 5 a altas concentraciones de NaCl.

Tabla No. 30.-Efecto de los solventes orgánicos o detergentes sobre la extracción del AHF de las resinas.

ADITIVO	% DE AHF EXTRAIDO
NINGUNO	40
ACETONA	55
BUTILAMINA	50
TWEEN - 80	58

Tabla No. 31.-Efecto de varios aditivos sobre la estabilidad del AHF a 20°C y a 4°C .

ADITIVO	% DE ACTIVIDAD DESPUES DE 24 HORAS	
	20°C	4°C
NINGUNO	30	55
ALBUMINA	35	60
GLUTATHIONE	50	60
TRASYLOL	45	55
LISINA	75	90

B - 7

UN METODO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE UN INTERMEDIARIO PURO Y
CONCENTRADO DE FACTOR ANTIHEMOFILICO PARA USO TERAPEUTICO

DANIEL T.H. LIU, J.F. IRWIN, R.O. LEFAVE, B. GRZENCZYK Y R.C. PAI

(1980)

UN METODO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE UN INTERMEDIARIO
PURO Y CONCENTRADO DE FACTOR ANTIHEMOFILICO PARA USO TERAPEUTICO

1. INTRODUCCION

Un intermediario puro de factor antihemofílico puede ser obtenido -- de plasma congelado, por descongelamiento del mismo. Obteniendo un crioprecipitado, extrayendo el AHF del crioprecipitado con agua o buffer y una adicional purificación por adsorción con hidróxido de aluminio (Hershgold y cols., 1966; Newman y cols., 1971; James y cols., 1972), figuras -- No. 27, 28 y 17. Este tipo de concentrado de AHF representa un producto con pureza intermedia entre el precipitado crudo y el concentrado de AHF altamente purificado, obtenido por una adicional purificación con PEG o glicina (Hershgold y cols., 1966; Newman y cols., 1971), figuras No. 27 y 28. Apesar de tener este concentrado alta pureza, posee la ventaja de alta potencia y buena solubilidad. La pérdida de rendimiento después de una etapa extra de fraccionamiento; usando alcohol, PEG o glicina tiene un -- rango de 20 a 35% como se reporta en la literatura (Hershgold y cols., -- 1966; Newman y cols., 1971) y de 35 a 50% en este experimento. Por lo cual, este tipo de intermediario puro del concentrado de AHF representa un -- producto con compromiso entre alta pureza y buen rendimiento.

Los autores demuestran en este reporte, que sin sacrificar rendimiento son capaces de producir un concentrado con mejor calidad y con las menores modificaciones al proceso estandar basado en el método de Hershgold y cols., 1966, Figura No. 28. Las modificaciones incluyen ajustes de pH del crioprecipitado a 6.85 más o menos 0.05 mientras se mezcla con el -- gel de hidróxido de aluminio y ajuste del pH de la solución final antes de la liofilización a 6.55-6.60 con buffer de fosfatos. El concentrado de AHF modificado tiene mejor tiempo de solubilidad, alta actividad específica y menor contenido de fibrinógeno que el concentrado estandar de AHF. Este es también más estable a temperatura ambiente después de re-- constituido en agua.

2. MATERIALES Y METODO

Preparación del concentrado de AHF: Aproximadamente de 500 a 1000 litros de plasma fresco congelado, los cuales mostraron no tener antígeno

de superficie de la hepatitis, fueron descongelados en un tanque enchaquetado con circulación de etilenglicol caliente. La temperatura del plasma fue mantenida a 1.5°C o menos durante todo el proceso de descongelamiento. Fue agregado etanol al plasma a una concentración final de 0.5%. El plasma descongelado fue entonces centrifugado en una centrifuga Sharples. El crioprecipitado pesando de 4 a 8 Kg fue recolectado. Una porción de crioprecipitado, usualmente 100 g, fueron usados a pequeña escala en el laboratorio; pasando el resto a un proceso adicional a gran escala.

La extracción del AHF del crioprecipitado y la adicional purificación con hidróxido de aluminio está basada en el método estandar de Hershgold y cols., 1966, excepto que el extracto en agua de el crioprecipitado fue ajustado a pH 7.0 en lugar de 7.1 y el periodo de espera a 4°C después de la adición del hidróxido de aluminio fue reducido de 18-30 horas a 1.5. La cantidad de agua extraída fue de 400 ml por cada 100 g de crio. El proceso modificado del estandar difiere en las siguientes áreas:

1.- El pH de la dilución del extracto de crio fue ajustada a 6.85 con HCl 0.1 N antes y después de la adición del hidróxido de aluminio, en lugar de pH 7.0 como en el proceso estandar.

2.- El pH de la solución final de AHF antes de la filtración estéril fue ajustado a 6.55-6.60 con HCl 0.1 N después de la adición de cloruro de sodio 5 M (6.3 ml por litro de solución) y buffer de fosfatos 0.4 M, pH 5.8 (10.5 ml por litro de solución). En el proceso estandar, el pH fue ajustado a 7.0 siguiendo la adición de la misma cantidad de cloruro de sodio 5 M y buffer de fosfatos 0.4 M, pH 7.1 a la solución final de AHF.

En ambos procesos, las soluciones de AHF fueron filtradas a través de un prefiltro para remover las partículas y entonces filtrado estéril usando una serie de membranas con medida de poro de 1.2, 0.45 y 0.22 micras. En la preparación del concentrado de alta potencia de AHF, las soluciones fueron concentradas por ultrafiltración con un concentrador Amicon DC-2 antes de la filtración estéril y liofilización. Porciones de 40 ml fueron puestas en viales de 50 ml, los cuales fueron congelados rápidamente con nitrógeno líquido. Los viales congelados fueron liofilizados en un congelador seco por 96 horas. La temperatura media inicial fue de -40°C y la temperatura final de 28°C más menos 2°C . Los viales liofilizados fueron reconstituidos en 10 ml de agua estéril a temperatura ambiente (23°C) o en baño de agua a 37°C .

La concentración de proteína fue determinada por el método de Biuret (método colorimétrico), usando albúmina bovina como estándar. La proteína coagulable fue expresada como el porcentaje de proteína total y fue determinada usando la diferencia en proteína total antes y después de coagulado el fibrinógeno con trombina. La actividad del factor VIII fue determinada por la prueba de PTT (Proctor y Rapaport, 1961. Este documento describe una técnica modificada de PTT, la cual mejora el contacto de activación del plasma prueba, esto causado por la adición del polvo de Kallin del reactivo de tromboplastina parcial), figura No. 29. La recuperación y purificación fueron calculados bajo la suposición de que el plasma inicial contiene 1 unidad de AHF y 62 mg de proteína por ml. En particular, el plasma fresco congelado usado en este experimento contenía un promedio de 0.75 U con un rango de 0.54 a 0.92 unidades por ml.

El gel de hidróxido de aluminio contiene 0.1446 g de hidróxido de aluminio por gramo de gel. Una suspensión de gel al 10% en agua destilada fue hecha y adicionada a la solución del extracto de crío en la cantidad de 10 microgramos de hidróxido de aluminio por gramo de proteína; la concentración de proteína fue determinada con un refractómetro y nuevamente determinada con una curva estándar.

El buffer de fosfatos 0.4 M y pH 7.1 fue preparado por adición de 145 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 420 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, aforando a 10 litros con agua destilada. El buffer de fosfatos 0.4 M y pH 5.8 fue preparado por adición de 460 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 94.6 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, aforando a 10 litros con agua destilada.

3. RESULTADOS

Las propiedades de los métodos estándar y modificado, y los resultados de los 7 lotes de concentrados de AHF preparados a escala en el laboratorio se muestran en la Tabla 32. Los resultados de las preparaciones a gran escala, 3 lotes con el método estándar y 6 con el modificado se muestran en la Tabla 33. El concentrado de AHF por el método modificado es superior al concentrado del método estándar, en los siguientes aspectos:

1.- Este tiene un tiempo de reconstitución corto. El promedio de tiempo es reducido, a escala en el laboratorio, de 4.0 a 2.1 minutos y en los

lotes a gran escala de 3.8 a 1.7 minutos a 23°C. Se tomaron deliberadamente viales del concentrado de AHF modificado de un refrigerador a 4°C e inmediatamente se reconstituyeron con agua estéril a 23°C y se solubilizaron dentro de los siguientes 5 min.

2.-Este tiene una alta actividad específica. La actividad específica aumentó en los lotes a escala en el laboratorio de 0.65 U/mg de proteína en el concentrado de AHF estandar a 0.78 U/mg de proteína en el concentrado de AHF modificado. Y en los lotes a gran escala de 0.70 a 0.88 U/mg de proteína. Este mejoramiento en la actividad específica fue en gran parte resultado de la reducción en la proteína total contenida en el concentrado modificado, pero no en la recuperación del AHF. La recuperación de la actividad del AHF para ambos concentrados, estandar y modificado, fueron idénticos; pero la proteína total bajó de 426 a 341 mg/vial en los lotes a escala en el laboratorio y de 388 a 315 mg/vial a gran escala.

Sin embargo, la purificación del AHF con respecto al plasma se incrementó de 41 a 44 veces en el concentrado de AHF estandar a 49-55 veces en el concentrado de AHF modificado.

3.-Este contiene menos proteína coagulable. No únicamente el concentrado de AHF modificado contiene menos proteína total que el concentrado estandar, además, la proporción de proteína atribuible a fibrinógeno fue también disminuida. La cantidad de proteína coagulable fue reducida de 55 a 50% en el laboratorio y de 54 a 47% en los lotes producidos en gran escala.

4.-Este es estable a temperatura ambiente después de ser reconstituido en agua. La solución de AHF modificada retiene de 94 a 97% de la actividad después de estar a 23°C por 24 horas y el concentrado estandar retiene únicamente de 76 a 80% bajo las mismas condiciones.

5.-El concentrado de AHF modificado reconstituido es claro y en general tiene mejor apariencia que el concentrado estandar en solución. Ambas soluciones, no obstante, son ligeramente amarillentas.

Los concentrados de AHF de alta potencia fueron obtenidos por concentración usando ultracentrifugación antes de la liofilización. Los viales liofilizados conteniendo 1000 U de AHF fueron reconstituidos en 20 ml de agua estéril dentro de los 5 min. No obstante, un tiempo más prolongado fue observado en los viales obtenidos de la solución de AHF estandar.

4. DISCUSION

Las mejores cualidades obtenidas en el concentrado de AHF modificado son el resultado de una combinación de 2 cambios de pH en el proceso: (1) Cambio de pH en la mezcla con hidróxido de aluminio, y (2) Cambio de pH en la solución de AHF final antes del liofilizado. Se observó un incremento en la actividad específica de la solución resultante de AHF cuando la mezcla del crío con el hidróxido de aluminio fue puesta a pH de 6.9 o 6.8 en lugar de 7.0. La proteína coagulable contenida en la solución resultante de AHF disminuyó considerablemente con el incremento de la actividad específica. No es aconsejable bajar el pH de la mezcla a menos de 6.8 en esta etapa porque esto causa pérdida en la actividad del AHF. También esto puede resultar al quitar aluminio de la solución (James HL y Wickerhauser, 1972), Fig. 17. No se encontraron dificultades en la filtración estéril de las soluciones de AHF preparadas por este procedimiento, usando estos valores de pH. Para obtener un buen rendimiento y alta pureza del AHF fue seleccionado el pH de 6.85 más menos 0.05 como el pH óptimo en esta etapa.

Cuando el concentrado de AHF fue hecho usando una simple modificación de pH (de 7.0 a 6.85) en la etapa de adsorción con hidróxido de aluminio, pero sin cambio de pH en la solución final (pH 7.0), los productos mostraron algún mejoramiento sobre los concentrados de AHF estandar en el tiempo de reconstitución, actividad específica y en el contenido de proteína coagulable, pero no es estable en solución después de 24 hrs de reconstituido. El pH de las soluciones reconstituidas en ambos métodos, estandar y modificado, es mayor (pH 7.8) que el pH óptimo de 6.9 (Vermeer y cols., 1976). Por esto, la disminución de la actividad del AHF en estas soluciones después de 24 horas era esperado. Aunque en el procedimiento estandar el pH de la solución final de AHF se ajustó siempre a 7.0, después de la adición de cloruro de sodio y buffer de fosfatos, el pH de los viales reconstituidos es siempre mayor de 7.0. Esto es probablemente debido a la baja concentración del buffer de fosfatos usado y a que la solución pierde CO_2 durante el proceso de liofilización.

Queriendo obtener un pH más neutro en los viales reconstituidos, se bajó el pH de la solución final de AHF a 6.55-6.60. Con esta simple modificación de pH en la solución final, pero sin cambio de pH del extracto

del crio en la etapa de adsorción con hidróxido de aluminio (pH de 7.0) es posible obtener un producto estable en solución y con mejorada solubilidad. La actividad específica y el contenido de proteína coagulable, de cualquier modo, quedó sin cambio. Los resultados indican que el concentrado de AHF obtenido con las características enlistadas en la Tabla 32 y 33 (cambio de pH en la etapa de adsorción y en la solución final) son necesarios. Un simple cambio de pH en cualquiera de las etapas resultó en un producto parcialmente mejorado.

Las mejoras obtenidas en el concentrado de AHF modificado, esto es, -- tiempo de reconstitución de 2-3 min, estabilidad completa después de 24 horas de reconstituido, mayor actividad específica, menor contenido de -- proteína coagulable, mayor claridad y experiencia general, son características altamente deseables para un concentrado terapéutico de AHF. De este modo, el concentrado de AHF modificado es una alternativa aceptable -- y no se tiene que sacrificar rendimiento ni aumentar el costo con un -- proceso de alta pureza. Además, las mejoras asociadas con este concentrado parecen hacer factible el manufacturar de 500 a 1000 viales por la -- técnica de ultrafiltración sin afectar significativamente las caracte-- rísticas de la solubilidad.

Un reciente documento de Smith y cols., 1979, indica que la etapa de -- precipitación en frío después de la adsorción con hidróxido de aluminio es esencial para la remoción de proteínas impuras del extracto de AHF. -- De acuerdo con este método mejorado, la adsorción con hidróxido de alumi-- nio es hecha a pH neutro a temperatura ambiente y la precipitación en -- frío es hecha a pH ligeramente ácido. En ambos procesos estandar y modifi-- cado, la precipitación en frío es parte del proceso y se incorporó a -- la etapa de adsorción. Estos resultados indican que si la combinación de la adsorción con hidróxido de aluminio y precipitación en frío es efectuada a pH ligeramente ácido en lugar de neutro, una mayor cantidad de -- concentrado de AHF puede ser obtenido.

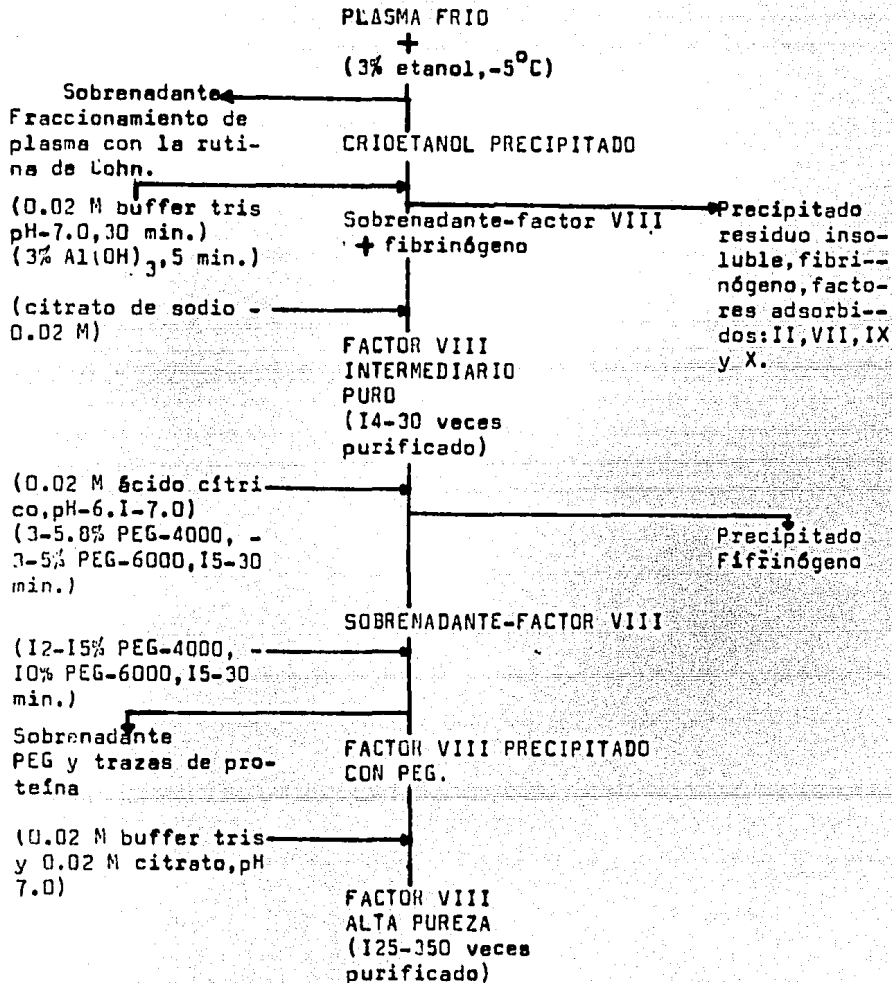
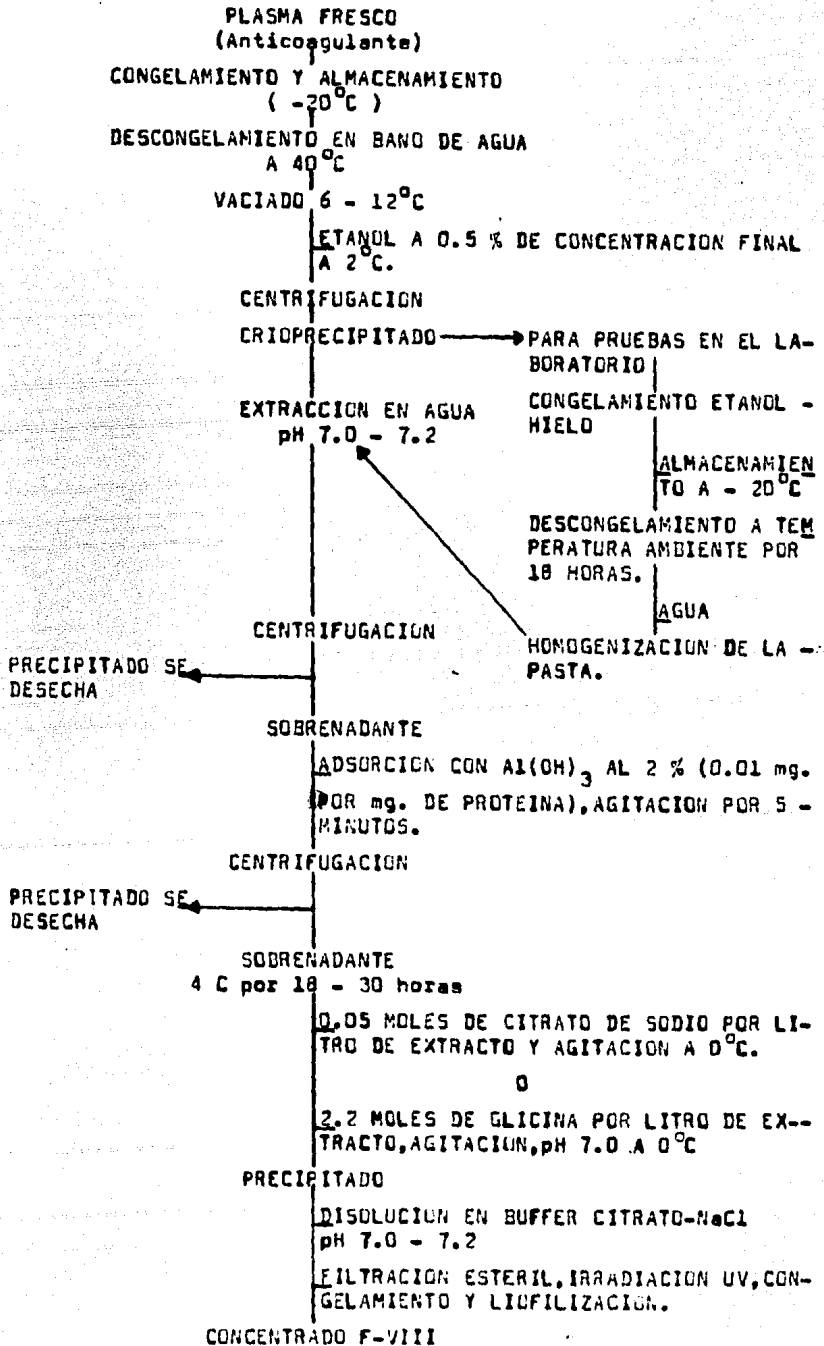


Figura No.27 Método de Newman Jack y colaboradores para la obtención de un intermediario altamente puro de Factor VIII partiendo de plasma fresco congelado, usando Polietilén glicol de 4000 o 6000 de peso molecular.

Figura No.28.-Método de Hershgold E J. y colaboradores (1966).



SANGRE VENOSA

+

ANTICOAGULANTE

(2 partes de ácido cítrico 0.1 M más 3 partes de citrato de sodio 0.1 M) 9 volúmenes de sangre más 1 de anticoagulante.

CEFALINA
(tromboplastina extraída de tejido cerebral humano)

EXTRACTO DE BELL Y ALTON
(tromboplastina extraída de tejido cerebral de conejo)

SUSPENSION DE POLVO DE KAOLIN
(2 gramos de polvo en 50 ml. de SSF)

MEZCLAS IGUALES DE TROMBOPLASTINA Y SUSPENSION DE KAOLIN

PLASMA PRUEBA

TROMBOPLASTINA PARCIAL
CON KAOLIN

CLORURO DE CALCIO
(solución 30 mM)

CLORURO DE CALCIO

0.2 ml.

(en un tubo)

+

0.2 ml.

Incubación a 37°C
por 3 min.

Pre calentado a 37°C

Se hace funcionar el
reloj

Se agita el tubo y se regresa al incubador Después de 30 seg. de adicionado el cloruro de calcio y a intervalos de 5 seg. se inclina suavemente el tubo

CCAGULO

(se para el reloj)

Figura No.29. Técnica de Proctor y Rapaport para Tiempo de Tromboplastina parcial con Kaolin.

Tabla 32. Propiedades de las preparaciones de AHF estandar y modificada-- hechas en el laboratorio.

	AHF Estandar		AHF Modificado	
	rango	promedio	rango	promedio
Tiempo de reconstitución en minutos:				
a 23°C	2.5-6.5	4.0	1.5-2.5	2.1
a 37°C	1.5-3.5	2.3	1.5-2.0	1.7
Potencia de AHF, U/vial	235-359	295	230-382	290
Proteína coagulable, %	51-60	55	48-55	50
Proteína, mg/vial	368-466	426	258-442	341
Actividad específica, U/mg.	0.42-0.77	0.65	0.55-0.97	0.78
Purificación sobre plasma (veces)	26-48	41	34-61	49
pH	7.7-8.0	7.8	7.0-7.1	7.0
Actividad después de 24 h, %	69-93	80	89-100	94
Rendimiento, U/litro de plasma	227-325	269	222-310	263

Tabla 33. Propiedades de las preparaciones de AHF estandar y modificado hechas a gran escala.

	AHF Estandar		AHF Modificado	
	rango	promedio	rango	promedio
Tiempo de reconstitución (minutos) a 23°C	2-5	3.8	1.5-2.5	1.7
Potencia de AHF, U/vial	261-270	265	246-314	275
Proteína, mg/vial	332-464	388	252-400	315
Proteína coagulable, %	50-57	54	43-53	47
Actividad específica, U/mg.	0.58-0.81	0.70	0.62-1.06	0.88
Purificación sobre plasma (veces)	36-51	44	39-66	55
pH	7.4-7.7	7.6	6.7-7.0	6.9
Actividad después de 24 h, %	67-89	76	88-100	97
Rendimiento, U/litro de plasma	193-239	214	192-255	221

B - 8

PREPARACION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y FIBRONECTINA A PARTIR DE CRIOPRECIPITADO DE PLASMA HUMANO

HOROWITZ B; LIPPIN A; CHANG MY; SHULMAN RW; VANDERSANDE J; STRYKER MH; WOODS KR. (1984)

PREPARACION DE FACTOR ANTIHEMOFILICO Y FIBRONECTINA A PARTIR DE CRIOPRECIPITADO DE PLASMA HUMANO

1.-INTRODUCCION

Este artículo presenta detalles de un proceso, compatible con las prácticas actuales de almacenamiento y fraccionamiento de plasma en los Bancos de Sangre, el cual da como resultado un alto rendimiento de un concentrado de AHF y una preparación de fibronectina plasmática purificada adecuados para pruebas clínicas (esta última técnica no será tratada aquí).

2.-MATERIALES Y METODO

EXPERIMENTOS PREVIOS

a)Uso de polietilén glicol

Un procedimiento comúnmente usado para la purificación del AHF es la precipitación de componentes (primeramente fibrinógeno) de el crioprecipitado con 3.5 a 4% de PEG a pH entre 6.5 - 7.0 (Brinkhous y cols., 1968; --- Newman y cols., 1971). Una serie de experimentos sobre el efecto de la concentración del PEG, fuerza iónica y pH no condujeron a identificar las -- condiciones apropiadas para la separación de AHF y fibronectina. Uno de -- estos experimentos se presenta a continuación:

Tratamiento de extractos de crioprecipitado con PEG. El crioprecipitado fue extraído con 3 volúmenes (w/v) de buffer Tris-HCl 0.002 M pH 7.0 y tratado con $Al(OH)_3$. Seguido de la clarificación, se adicionó citrato de sodio a una concentración final de 0.02 M y el pH ajustado a 7.0 con --- NaOH 1.0 M y HCl. Siguiendo la adición de PEG 4000 a la concentración indicada, las muestras fueron mezcladas por 30 minutos a temperatura ambiente y clarificadas por centrifugación. El AHF y la Fibronectina fueron determinados en el sobrenadante.

Las gráficas de la figura No.30 sugieren que a 6% o 8% de PEG a pH 6.1 o 6.5 se favorece una relativamente mayor precipitación de fibronectina en comparación con el AHF en la fase líquida. De cualquier modo bajo estas condiciones por arriba de 50% del AHF se pierde.

Si se observa la figura No.30 es fácil ver que a 4% de PEG no es posible separar AHF y fibronectina.

b) Precipitación en frío

Desde los estudios de Smith y cols., 1979 se ha mostrado que la temperatura de 10°C favorece la precipitación de contaminantes de la solución de AHF, el efecto de la concentración de citrato a pH 6.4, 6.6, 6.8 sobre la solubilidad relativa del AHF y fibronectina a 10°C fue estudiada. Variaciones en la concentración de citrato de 0.001 a 0.020 M han influenciado grandemente la solubilidad de la fibronectina, mientras que la solubilidad del AHF permaneció relativamente alta (figura No. 31). También, con citrato 0.001 M y ligeros cambios de pH afectan grandemente la solubilidad de la fibronectina con considerablemente pequeños efectos sobre el AHF.

Separación de AHF y Fibronectina. El crioprecipitado fue lavado con 4 volúmenes (w/v) de buffer tris-HCl 0.02M, pH 7.0 a 0°C, y entonces extraído por 30 minutos con 2 volúmenes (w/v) del mismo buffer a temperatura ambiente. Seguido de la adsorción con $Al(OH)_3$ y clarificación, el pH fue ajustado a el valor indicado (6.4, 6.6, 6.8) con ácido cítrico 0.1M. Para llevar la concentración de citrato a 0.01 M y 0.02 M, buffer citrato de sodio/ácido cítrico fue adicionado al valor de pH asignado. La temperatura fue reducida a 10°C y el precipitado removido por centrifugación. El AHF y la fibronectina fueron determinados en los sobrenadantes. El crioprecipitado fue lavado, como se describe al principio de este experimento, con el propósito de remover el plasma intersticial (Wickerhauser y cols., 1978).

METODO PRINCIPAL

El crioprecipitado de plasma humano fue preparado a partir de plasma congelado proveniente de sangre tratada con citrato-fosfato-dextrosa-adenina-1 (CPDA-1). El crioprecipitado fue aislado (a pequeña escala) por el uso de una centrifuga de banco de sangre refrigerada y a gran escala en una centrifuga de flujo continuo, el crioprecipitado fue almacenado congelado a -30°C hasta su uso. Posteriormente éste fue lavado con buffer tris-HCl 0.02 M pH 7.0 entre 0 y 2°C con una relación de 1 a 4 (w/w). El precipitado rico en AHF fue recuperado y extraído a 20-25°C en buffer tris-HCl 0.02 M pH 7.0 con una relación de 1 a 2 (w/w) basado sobre el peso original del crioprecipitado. La suspensión de hidróxido de aluminio (óxido de aluminio 2%) fue adicionado a una concentración final de 4% (v/w) y posteriormente fue removido por centrifugación. El pH del ---

fluido sobrenadante fue bajado a 6.5 con ácido cítrico 0.1 M y la temperatura reducida a 10°C. El precipitado rico en fibronectina fue removido por centrifugación. Cloruro de sodio sólido fue adicionado al fluido sobrenadante a una concentración final de 0.05 M, y el pH fue ajustado a 7.0 con citrato de sodio 1 M. Esta solución fue filtrada a través de un filtro (Pall PB, Cortland, NY), concentrada de 2 a 3 veces por ultrafiltración en un cartucho hueco de fibra (Romicon PM 36, Woburn, MA), filtrado estéril, congelado y liofilizado (figura No.32).

3.-RESULTADOS

En la tabla No.34 se describen las variaciones de actividad y rendimiento durante las diferentes etapas del presente método de obtención de factor VIII.

La principal pérdida de AHF y proteína ocurre durante la etapa de precipitación a 10°C, debe ser enfatizado que el relativo buen éxito de la subsecuente filtración depende de la remoción de la fibronectina. El 81% de la fibronectina presente en el sobrenadante de hidróxido de aluminio precipita durante la etapa de precipitación a 10°C. Un beneficio de la remoción de una cantidad considerable de fibronectina del AHF fue la mejorada recuperación del AHF seguida de la filtración estéril, además de una disminuida área de superficie para filtrar. En adición, las propiedades dinámicas de la solución resultante de AHF permitió el uso de ultrafiltración como una etapa de concentración en lugar de concentrar por precipitación con PEG o otros agentes.

El producto ha demostrado ser hemostáticamente efectivo, estable por más de 2 años almacenado a 4°C y a 32°C por 18 meses, y soluble en 85 segundos cuando reconstituido.

La potencia del AHF se determinó por la técnica en una etapa de Langdell y cols., 1953. (figura No.11)

4.-DISCUSION

Los problemas más frecuentes durante la obtención de AHF son: bajos rendimientos, pobre filtración, baja solubilidad seguida de la liofilización. El AHF producido por este método se caracteriza por su rápida solubilidad, estable durante almacenaje y apropiado para uso humano. El fácil manejo de la solución de AHF tanto como su rápida solubilidad como producto final, probablemente fue una consecuencia de la remoción de la fibronectina durante la etapa de precipitación a 10°C.

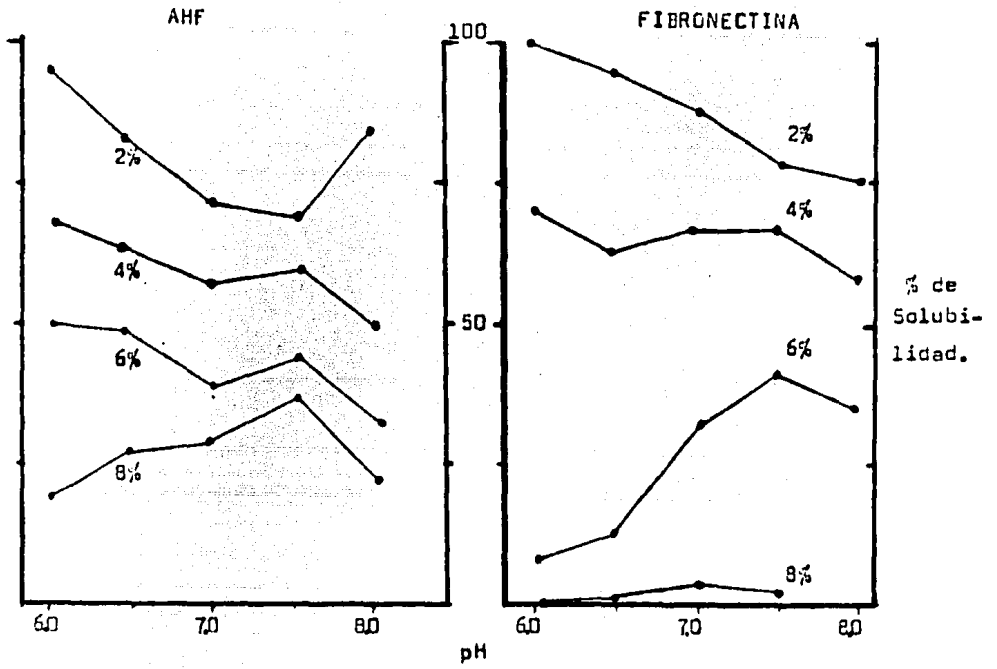


Figura No. 30-Tratamiento de los extractos de crioprecipitados con PEG.

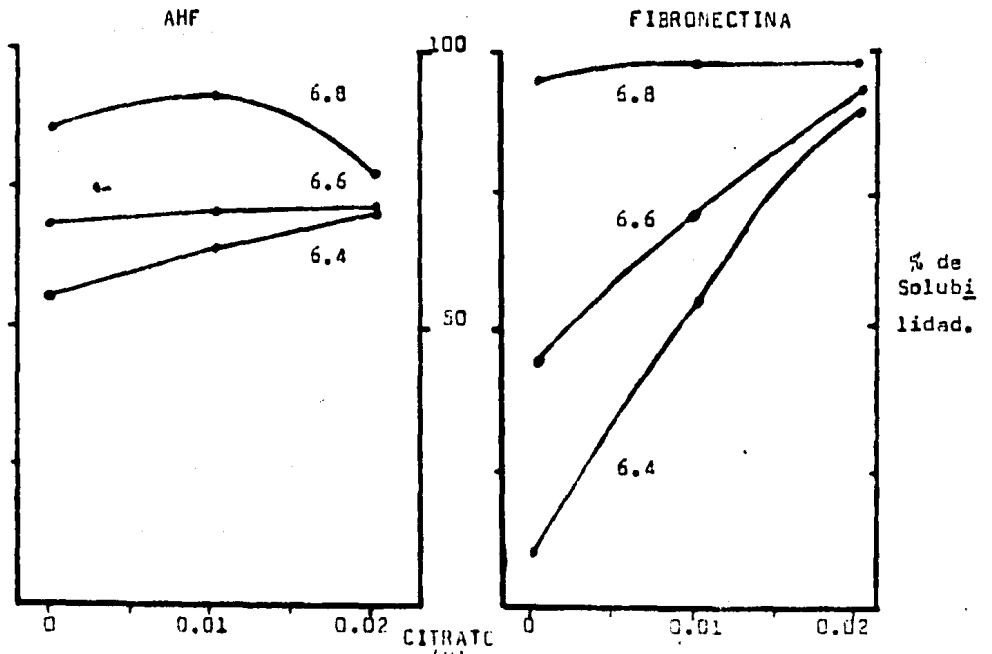


Figura No. 31.-Separación de AHF / Fibronectina por precipitación en frío.

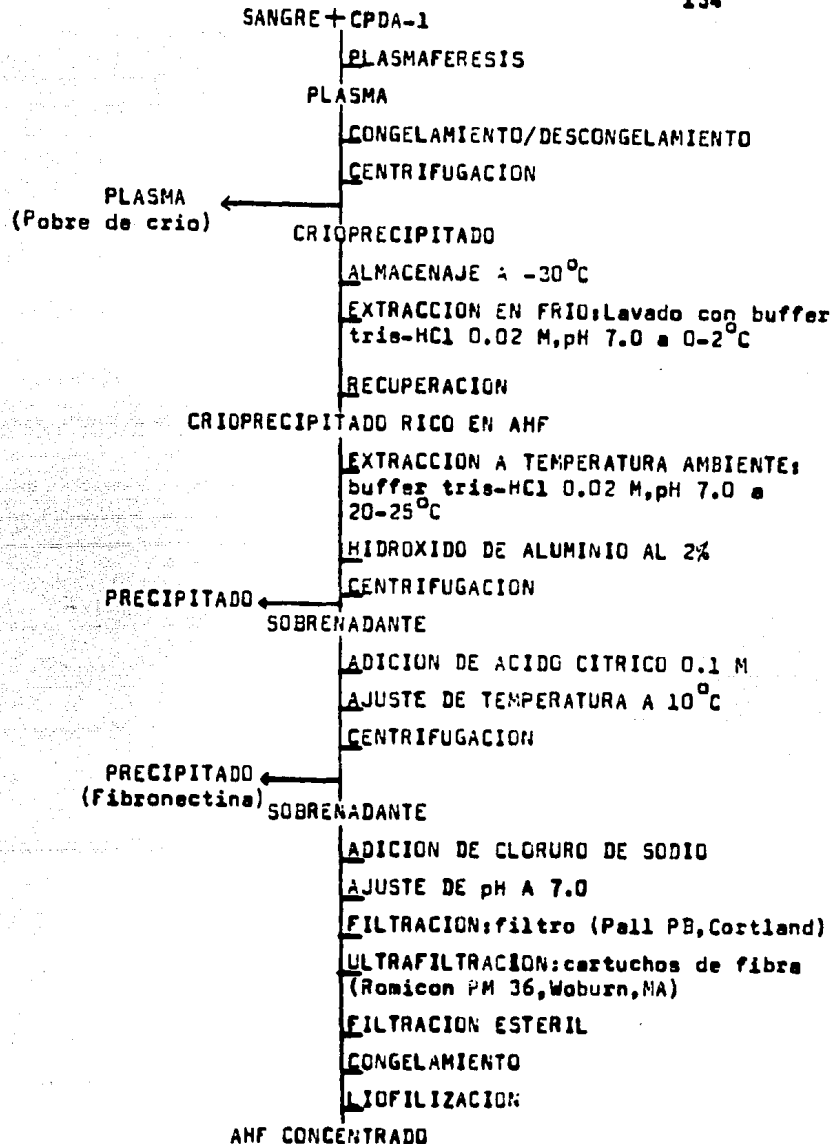


Figura No.32-Método de Morowitz y cols.,1984 para la obtención de AHF y Fibronectina

Tabla No.34-Factor antihemofílico producido por el Banco Central de
New York (promedio de cinco lotes)

ETAPA	LITROS	PROTEINA		A H F		
		mg/ml	g TOTAL	u/ml	RENDIMIENTO	u/mg ^{&}
EXTRACTO EN FRIO	77.84	3.46	266	0.14	2	0.04
EXTRACTO A TEMPE- RATURA AMBIENTE	53.04	30.90	1559	10.42	98	0.34
SOBRENADANTE Al(OH) ₃	51.04	25.28	1278	10.87	99	0.43
SOBRENADANTE 10°C	47.48	8.30	389	7.69	66	0.93
FILTRADO	47.20	8.66	405	7.51	64	0.87
ULTRAFILTRADO	16.80	22.96	372	20.03	59	0.87
LIOFILIZADO (30 ml/vial)	9.39	34.60	310	31.40	51	0.91

[&] ACTIVIDAD ESPECIFICA.

D I S C U S S I O N

G E N E R A L

DISCUSION GENERAL

En esta parte del trabajo discutiré las diferentes técnicas - utilizadas en la obtención de concentrados de factor antihemofílico humano y sus resultados. Además, como hacer la mejor - elección de la técnica, tratamiento y pruebas de coagulación, para finalmente emitir las conclusiones.

A. OBJETIVOS

Los trabajos de investigación aquí descritos tienen como - principal objetivo aumentar el rendimiento y pureza de los -- concentrados de factor antihemofílico, tomando como referen- cia los métodos e investigaciones hechas por otros autores.

A continuación se presentan los objetivos particulares de- cada método, sus técnicas y resultados:

Método A-1

Obtención de crioprecipitados a partir de donaciones sim- ples de sangre (uso de sistemas de bolsas).

Método A-2

Los autores presentan un método con el que se obtiene un - mayor rendimiento de factor antihemofílico durante la crioprg cipitación por adición de PEG-4,000 al plasma inicial a una - concentración final de 1% (w/v).

Método A-3

Este método tiene como objetivo observar el efecto de las- siguientes variables sobre la recuperación del crioprecipita- do:

- a) Elección del anticoagulante (ACD o CPD)
- b) Edad del plasma
- c) Duración del descongelamiento
- d) Grupo sanguíneo (ABO)

Método A-4

Describir una técnica de obtención de crioprecipitados por- reunión de 2 a 5 donaciones de plasma sanguíneo en un sistema-

abierto.

Método B-1

El propósito de este trabajo es la obtención de un concentrado de factor antihemofílico precipitado con glicina y comparar algunas propiedades de éste con las de un concentrado de baja potencia.

Método B-2

Con éste procedimiento, un producto relativamente estable de alta pureza puede ser hecho en cantidades de miligramos. - Esta preparación es apropiada para estudios fisicoquímicos y biológicos.

Método B-3

Mediante el método descrito aquí se pretende obtener un -- concentrado altamente puro mediante el uso de Defibrase (enzima parecida a la trombina) para remover el fibrinógeno de concentrados de factor antihemofílico de baja pureza.

Método B-4

Usando el método de obtención de James y Wickerhauser -- (1972), se pretende obtener un concentrado de factor antihemofílico usando como materia prima plasma proveniente de sangre almacenada de 4 a 6 días antes de su separación, es decir, -- plasma no fresco.

Método B-5

El documento describe como la extracción fraccionada del -- crioprecipitado, usando la temperatura como parámetro principal, puede ayudar a incrementar la pureza y potencia del concentrado de AHF sin adicionar algún nuevo reactivo al sistema basándose esta técnica en el método de James y Wickerhauser-- (1972).

Método B-6

Obtener un concentrado de factor antihemofílico a partir de plasma humano, por el uso de resinas (copolímeros de estileno/-anhidrido melánico sustituidos con dimetilaminopropilamida).

Método B-7

Los autores demuestran en su reporte que sin sacrificar -- rendimiento son capaces de producir un concentrado con mejor calidad y con las menores modificaciones al proceso estándar basado en el método de Hershgold y cols., 1966.

Método B-8

Obtención de un concentrado de factor antihemofílico purificado, el cual se logra mediante la separación de la Fibronec tina en uno de los pasos.

B. TECNICAS

Método A-1

Sangre con anticoagulante ACD o CPD es centrifugada, congelada y posteriormente descongelada a 4 °C por 18 a 24 hrs. El crioprecipitado es separado por centrifugación y congelado a -20 °C hasta su uso. A cada bolsa de crioprecipitado se le adiciona de 10 a 20 ml. de solución salina estéril y se descongela a 37 °C en un baño de agua, para ser usado dentro de las 2 hrs. siguientes.

Método A-2

Después de haber separado el plasma de la sangre entera y congelarse /descongelarse a 37 °C, se adiciona PEG a una concentración final de 1% y se ajusta el pH a 7.5, se congela el plasma-PEG a -70 °C y se descongela éste obteniéndose el crioprecipitado.

Método A-3

La sangre fue almacenada por periodos de tiempo variable -- (2,4 o 18 hrs.) antes de la separación del plasma por centrifugación. El plasma así separado fue congelado inmediatamente y procesado como se describió anteriormente, para obtener datos referentes a la elección del anticoagulante, a la edad del plasma, a la duración del descongelamiento y la importancia -- del grupo sanguíneo de los donadores.

Método A-4

Se obtienen crioprecipitados individuales de donaciones individuales por congelamiento/descongelamiento del plasma. Posteriormente se juntan de 2 a 6 crioprecipitados en una sola -- bolsa.

Método B-1

Para esta técnica se utilizó sangre extraída en citrato el-

4%, del cual se obtuvo un crioprecipitado que fue redissuelto y precipitado posteriormente con PEG (peso molecular 6,000).- Al sobrenadante obtenido se le adicionó glicina 2.3 M, el precipitado fue disuelto, vaciado en viales y liofilizado.

Método B-2

Como material inicial se utiliza crioprecipitados, el aislamiento involucra la adsorción de contaminantes con $Al(OH)_3$, cromatografía en columna sobre citrato trisódico-celulosa, -- precipitación con concanavalina A, filtración en gel de agarosa y precipitación con PEG.

Método B-3

Después de la obtención del crioprecipitado éste es sometido a la acción de la Defibrasa por periodo de 1 y 4 hrs. y posteriormente se separa el fibrinógeno.

En el otro experimento descrito aquí, a un crioprecipitado obtenido en presencia de dextran se le adiciona Defibrasa, se separa rápidamente el fibrinógeno formado y se deja el sobrenadante por toda la noche a 4 °C y se centrifuga. Para concentrar el factor VIII, se adiciona etanol a una concentración final del 15%, el precipitado es recuperado, redissuelto y extraído posteriormente de una columna de Sephadex.

Método B-4

Se utilizó como base el método de James y Wickerhauser -- (1972).

Se intentó mejorar la pureza y solubilidad del AHF tomando viales obtenidos mediante el método antes descrito, a los que se les adicionó PEG 4,000 a 22 °C. Los pasos más importantes se describen a continuación:

a) El pH de la solución inicial (viales reconstituidos en agua) fue ajustado de 7.3 a 6.5.

b) Se adicionó PEG a una concentración de 4.5% para el primer experimento y 4.0% en el segundo.

- c) Se separó el precipitado por centrifugación y se desechó
- d) Las soluciones sobrenadantes fueron ajustadas a pH 6.05- y se les adicionó PEG a una concentración final de 11%.
- e) Los AHF obtenidos fueron recuperados por centrifugación- y disueltos después en buffer tris-citrato.

Método B-5

Para incrementar la pureza y potencia del concentrado de -- AHF preparado por el método de James y Wickerhauser (1972), -- las siguientes modificaciones son introducidas:

a) Una etapa de extracción en frío fue incorporada para remover las impurezas solubles en frío. El crioprecipitado fue -- extraído con buffer tris 0.02 M y pH 7.0 (4 ml/g de crio) a -- 0 °C.

b) El AHF fue recobrado de la porción insoluble en frío por extracción a 21 °C con el mismo buffer. Para incrementar la -- concentración del AHF, esta segunda etapa de extracción fue -- realizada con pequeños volúmenes de buffer (2 ml en lugar de - 3-4 ml/g de crio).

Se utilizó sangre CPD, la cual fue centrifugada dentro de - las 6 hrs. siguientes a su recolección.

Se probó la adsorción del extracto con cantidades incremen- tadas de $Al(OH)_3$, a saber 0.43, 0.65 y 0.86 ml/g de crio.

La etapa de extracción en frío se realizó con buffer tris-- HCl en un experimento y con agua en el otro.

Método B-6

Plasma tratado con anticoagulantes es mezclado con E-100 a pH 8.0 y 4 °C por 5 minutos, se centrifuga o filtra. El sobrenadante es tratado con E-5 a pH 6.0 y 4 °C, posteriormente se lava con buffer NaCl 1.5 M-Lisina 1.0 M. pH 7.4. Para extraer - el factor antihemofílico, al extracto se concentra por ultrá filtración y precipitación con PEG.

Método B-7

Esta técnica se basa en el método de Hershegold y cols., -- (1966), al cual se le efectuaron las siguientes modificaciones:

- a) Ajuste del pH del crío-extracto a 6.8-6.9 mientras se mezcla con el $\text{Al}(\text{OH})_3$.
- b) Ajuste de pH de la solución final antes de la liofilización a 6.5-6.6.

Método B-8

La etapa más importante de este método es la separación de la fibronectina (la cual puede ser purificada posteriormente). Después de la adición del $\text{Al}(\text{OH})_3$ y centrifugación, se agregó ácido cítrico y se ajustó la temperatura a 10°C , precipitando de esta manera la fibronectina. Esta precipitación en frío facilita las filtraciones subsecuentes, logrando incluso la concentración por ultrafiltración en lugar de precipitación con PEG o otros agentes.

C. RESULTADOS

En el cuadro No. I se muestran los diferentes métodos de obtención de concentrados de factor antihemofílico, en el se aprecian las características más relevantes del producto y una serie de comentarios que son el resultado del análisis de cada técnica. Los hallazgos mencionados anteriormente pueden ser aplicables al método específico de origen o pueden considerarse aisladamente uno o varios de ellos para adicionarse a algún procedimiento en particular.

C U A D R O No. I

METCDC	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
A-1	Pool J.G.	1975	<p>MP: Donaciones individuales de <u>sangre</u>.</p> <p>EC: Satisface</p> <p>RE: 50% del presente en el <u>plasma fresco</u>.</p> <p>F: 125 U/bolsa.</p>	<p>1) MEZCLAR PERFECTAMENTE LA -- SANGRE CON EL ANTICOAGULANTE.</p> <p>2) EL CRIOPRECIPITADO ES DES-- CONGELADO EN BANO DE AGUA A 37 °C Y DEBE SER INYECTADO-- DENTRO DE LAS 2 HRS. SIGUIENTES.</p>
A-2	Johnson A.J.	1979	<p>MP: Plasma</p> <p>GE: Satisface</p> <p>AE: 0.38 u/mg de - proteina</p> <p>PU: 25 Veces con - respecto al <u>plasma</u>.</p>	<p>1) LA SANGRE DEBE SER ALMACENADA A 4 °C DURANTE EL PERIODO PREVIO A SU CENTRIFUGACION.</p> <p>2) EL CRIOPRECIPITADO SERA SEPARADO INMEDIATAMENTE DES-- FUES DEL DESCONGELAMIENTO - POR CENTRIFUGACION.</p> <p>3) CON EL PROPOSITO DE OBTENER UN CRIOPRECIPITADO CON MAYOR CONCENTRADO DE AHF SE</p>

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
A-3	Wenslen R.T.	1980	P: Anticoagulante ACD= 55 U, CPD= 76 U EDAD DE PLASMA: 2-18 h= 62-68 u/ crio. DESCONGELAMIENTO RA PIDO: 68 u/crio GRUPO A: 89.7 u/crio	ADICIONO PEG - 4,000 AL -- PLASMA INICIAL A UNA CONCEN TRACION FINAL DE 1%. 4) EL DESCONGELAMIENTO DEL --- PLASMA A 2 °C DIO MEJOR REN DIMIENTO DE AHF. 5) CUANDO SE AJUSTO EL pH A -- 7.5 DESPUES DE LA ADICION-- DEL PEG SE OBTUVIERON MEJO RES RESULTADOS DE RECUPERA CION DE AHF. 1) EL PLASMA RECOLECTADO EN -- CPD DA MAYOR RENDIMIENTO -- DEL CRIOPRECIPITADO DE FAC TOR VIII. 2) EL PLASMA FRESCO (EL SEPARA RADO Y CONGELADO ENTRE LAS- 18 HRS. SIGUIENTES A LA RE COLECCION DE LA SANGRE) DA- EXCELENTE RECUPERACION DE - FACTOR VIII.

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
			GRUPO O: 70.2 u/crio PE: Satisface MP: Donaciones individuales de sangre.	3) EL DESCONGELAMIENTO RAPIDO-DEL PLASMA (2.5 HRS. A 8 °C) FAVORECE LA RECUPERACION DE AHF. 4) LOS CRIOPRECIPITADOS DERIVADOS DEL GRUPO SANGUINEO "A" CONTIENEN 28% MAS ACTIVIDAD DE FACTOR VIII QUE LOS DEL-GRUPO "O".
A-4	Mentitove J.E.	1983	MP: Donaciones individuales de plasma. RE: 48% P: 129.1 u/bolsa EC: Satisface PE: Satisface	1) LA REUNION DE 2 A 8 CRIOS - EN UNA SOLA BOLSA ES UN METODO ACEPTABLE PARA AUMENTAR LA CONCENTRACION DE LOS CRIOS DERIVADOS DE DONACIONES INDIVIDUALES. 2) SE SUGIERE EL USO DE CRIOPRECIPITADOS COMPATIBLES -- CON EL GRUPO SANGUINEO ABO PARA EVITAR QUE LOS GLOBULOS ROJOS DE LOS PACIENTES SEAN CUBIERTOS POR ISOAGLU-

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
				TININAS
B-1	Brinkhous K.M.	1968	EC: Satisface MP: Crioprecipitados. P: 1,050 u/vial PU: 162 veces AE: 1,600 a 5,500 - u/g de proteina. E: Satisface S: Satisface GE: Satisface	1) EL CRIOPRECIPITADO FUE DISUELTO Y SE LE ADICIONA PEG 6,000, ESTE FUE ESCOGIDO PORQUE SUS SOLUCIONES SON POCO VISCOSAS Y NO CAUSA DESNATURALIZACION A TEMPERATURA AMBIENTE, PARA PRECIPITAR EL FIBRINOGENO. 2) SE ADICIONA GLICINA PARA PRECIPITAR EL F-VIII CON EL PASO FINAL.
B-2	Legaz M.E.	1973	MP: Crioprecipitados PU: 500 Veces con respecto al <u>crio</u> precipitado y 3000 a 5000 veces con respecto al plasma PE: Satisface E: Por 2 semanas, despues de 4 sema--	1) LA ETAPA DE ADSORCION CON $Al(OH)_3$ SIRVE PARA REMOVER FACTOR VII, IX, X, PROTROMBINA Y FIBRINOGENO. 2) SE USA LA CONCAVALINA PARA PRECIPITAR EL FACTOR VIII Y LA FILTRACION EN GEL DE AGAROSA PARA SEPARAR EL FACTOR VIII DE LA CONCAVALINA.

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO.	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
B-3	Lopaciuk S.	1975	<p>nas 50% .</p> <p>MP: Plasma citratado.</p> <p>AE: 2530-6250 u/g - de protefna.</p> <p>PU: 200 - 400 veces</p> <p>E: Por 48 hrs. a - temperatura ambiente, una semana a 4 °C y 3 meses a - 25 °C.</p> <p>PE: Satisface.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) SE UTILIZA DEFIBRASA (ENZIMA SEMEJANTE A LA TROMBINA) PARA REMOVER EL FIBRINOGENO. 2) PARA CONCENTRAR EL F-VIII, - UNA ETAPA DE PRECIPITACION EN FRIO CON ETANOL FUE EMPLEADA. ADEMAS EL CONCENTRADO SE HIZO PASAR A TRAVES DE UNA COLUMNA DE SEPHADEX PARA SU MAYOR PURIFICACION.
B-4	Wickerhauser 1976 N.		<p>MP: Sangre almacenada de 4 a 6 dias (Plasma no fresco).</p> <p>GE: Satisface</p> <p>P: 5.8 - 7.9 u/ml., 32.7 u/ml.</p> <p>PU: 6.5-9.6, 100</p> <p>S: 1 minuto</p> <p>RE: 60%</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) LA SANGRE ALMACENADA POR ARRIBA DE 21 DIAS EN FRIO CONTIENE AUN EL 60% DE LA ACTIVIDAD ORIGINAL. 2) HAY PEQUENA HEMOLISIS EN SANGRE ALMACENADA POR MAS DE 6 DIAS. 3) LA ETAPA DE EXTRACCION CON VOLUMENES REDUCIDOS DE BUFFER, 2ml. EN LUGAR DE 3 --

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO.	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
B-5	Wickerhauser 1978 M.		MP: Plasma fresco PE Y GE: Satisface RE: 225-247 u/litro de plasma FU: 40-45 veces S: 5 minutos	<p>POR GRAMO, CAUSA MENOR FILTRABILIDAD Y SOLUBILIDAD.</p> <p>4) LA ADICION DE 1 A 2% DE -- GLUCOSA O 1% DE GLICINA ANTES DE LA LIOFILIZACION MEJORA LA SOLUBILIDAD DEL PRODUCTO.</p> <p>5) LA EXTRACCION A TEMPERATURAS MAYORES DE 20 °C AFECTA LA FILTRABILIDAD.</p> <p>6) CUANDO SE UTILIZO PEG AL 4 % EN LUGAR DE 4.5% PARA -- PRECIPITAR EL FIBRINOGENO, LA SOLUCION RESULTO INFILTRABLE.</p> <p>1) EL LAVADO DEL CRIO A-5 °C CON 8% DE ETANOL PARA REMOVER LAS PROTEINAS OCLUIDAS INCREMENTA LA PUREZA DEL AHF.</p> <p>2) EL PLASMA CONGELADO ES CORRIDO PARA AUMENTAR EL AREA</p>

MÉTODOS	AUTOR	AÑO	CARACTERÍSTICAS DEL CONCENTRADO.	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
			<p>P: 24.3 u/ml. E: 29 hrs.-91% 5 meses 5 °C- 97%</p>	<p>EXPUESTA Y ACELERA EL DES- CONGELAMIENTO.</p> <p>3) LA PRIMERA ETAPA DE EXTRAC- CIÓN SE REALIZO A 0 °C PA- RA REDUCIR LA SOLUBILIDAD- DEL AHF PERMITIENDO LA EX- TRACCIÓN DE LA PROTEINA SO- LUBLE.</p> <p>4) LA SEGUNDA ETAPA DE EXTRAC- CIÓN DEL CRIO FUE LLEVADA- A CABO ENTRE 20 Y 22 °C PA- RA FACILITAR LA EXTRACCIÓN DEL AHF.</p> <p>5) SE OBSERVO QUE LA ADSORCI- ÓN DEL EXTRACTO DE AHF CON CANTIDADES INCREMENTADAS - DE $Al(OH)_3$ 0.65 o 0.86 -- ml/g. DE CRIO (NORMAL 0.43 ml/g) DA COMO RESULTADO LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL F-VIII.</p>

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
B-6	Johnson A.J.	1978	MP: Plasma PE: Satisface GE: Satisface RE: 43% PU: 50 veces con -- respecto al plag ma.	<p>1) MEDIANTE ESTA TECNICA SE OBTIENE AHF SIN vWF.</p> <p>2) LA TECNICA INVOLUCRA: ADSORCION SOBRE LA FASE SOLIDA (POLIELECTROLITOS, EXTRACCION DE LA FASE SOLIDA Y CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION O USANDO PEG).</p> <p>- EN LA PRIMERA ETAPA SE USA E-100 lmg/ml. PARA ABSORVER LOS FACTORES II, VII, IX Y X. SE CENTRIFUGA O FILTRA, EL SOBRENADANTE CONTIENE AL F-VIII.</p> <p>- EN LA SEGUNDA ETAPA SE USA E-5 60 mg/ml. SE LAVA ESTA CON NaCl PARA REMOVER LA ALBUMINA Y OTRAS PROTEINAS. EL FACTOR VIII SE EXTRAE CON BUFFER NaCl 1.5 M- LISINA 1.0 M A pH 7.4. SE USA BETONITA PA-</p>

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRATO.	ETAPAS CLAVES/COMENTARIOS
B-7	Liu D.T.H.	1980	MP: Plasma GE: Satisface S: 5 min. AE: 0.88 u/mg. de proteina. PU: 49-55' veces E: Satisface.	<p>RA REMOVER EL FIBRINOGENO DEL SOBRENADANTE.</p> <p>- EL SOBRENADANTE SE CONCENTRA POR ULTRAFILTRACION Y/O POR ADICION DE 20% (w/v) DE PEG.</p> <p>1) EL PH DE LA SOLUCION DE FRIO FUE AJUSTADO A 6.85 - ANTES Y DESPUES DE LA ADICION DE $Al(OH)_3$ 10 mg/g - DE PROTEINA.</p> <p>2) LA SOLUCION FINAL FUE AJUSTADA A PH 6.55-6.60 ANTES DE LA LIOFILIZACION.</p> <p>3) SI SE COMBINA LA ADSORCION CON $Al(OH)_3$ Y LA PRECIPITACION EN FRIO A UN PH LIGERAMENTE ACIDO EN LUGAR - DE NEUTRO, UNA MAYOR CONCENTRACION DE AHF PUEDE SER OBTENIDO.</p>

METODO	AUTOR	AÑO	CARACTERISTICAS DEL CONCENTRADO.	ETAPAS CLAVE/COMENTARIOS
B-8	Horowitz B.	1984	<p>MP: Plasma</p> <p>GE: Satisface</p> <p>EC: Satisface</p> <p>E: 2 años a 4 °C 18 meses a 32 °C.</p> <p>S: 85 seg.</p> <p>AE: 0.91 u/mg. de proteína</p> <p>RE: 51%</p> <p>P: 31.4 u/ml.</p>	<p>1) EL LAVADO DE EL CRIOPRECIPITADO CON BUFFER TRIS HCl 0.02 M pH 7, ENTRE 0 y 2 °C CON UNA RELACION DE VOLUMEN DE 1 A 4 (w/w) AYUDA A REMOVER EL PLASMA INTERSTICIAL, MEJORANDO LA PUREZA.</p> <p>2) CON EL FIN DE REMOVER LA FIBRONECTINA, DESPUES DE LA EXTRACCION DEL CRIO -- CON $Al(OH)_3$ A UNA CONCENTRACION FINAL DE 4% (v/w), SE AJUSTO EL pH A 6.5 Y LA TEMPERATURA A 10 °C. EL PRECIPITADO FUE REMOVIDO -- POR CENTRIFUGACION.</p> <p>3) LA SOLUCION RICA EN AHF -- FUE CONCENTRADA POR ULTRAFILTRACION EN LUGAR DE PRECIPITACION CON PEG U OTROS AGENTES (AL REMOVER LA FIBRONECTINA SE FACILITA LA-</p>

METODO	AUTOR	AÑO	CAR. CTERISTICAS DEL CONCENTRADO.	ETAPAS CLAVE/COMENTARIOS
--------	-------	-----	--------------------------------------	--------------------------

FILTRACION).

DONDE: MP= MATERIA PRIMA
GE= GRAN ESCALA
PE= PEQUENA ESCALA
P= POTENCIA
AE= ACTIVIDAD ESPECIFICA
PU= PURIFICACION
RE= RECUPERACION DE AHF
E= ESTABLE
S= SOLUBLE
EC= EFECTIVO PARA USO CLINICO.

D. ELECCION DE LA TECNICA

La elección de algún método en particular o alguna (s) parte (s) de ellos se puede hacer tomando en cuenta las respuestas a las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Con qué tipo de materia prima se cuenta?

Possibilidades:

 - a) Donaciones individuales de sangre
 - b) Sangre almacenada por varios días antes de la separación del plasma.
 - c) Plasma
 - d) Crioprecipitados.
- 2.- ¿Qué tipo de concentrado se desea obtener?

Possibilidades:

 - a) Crioprecipitados en bolsas individuales.
 - b) Crioprecipitados reunidos de varias donaciones.
 - c) Concentrados del factor antihemofílico.
- 3.- ¿Con qué pureza se desea obtener el producto?

Possibilidades:

 - a) Concentrados de baja pureza Δ ; 1 a 10 veces (purificación con respecto al plasma).
 - b) Concentrados de mediana pureza Δ ; 10 a 100 veces (purificación con respecto al plasma).
 - c) Concentrados de alta pureza Δ ; 100 a 1000 veces (purificación con respecto al plasma).

Δ Clasificación según Brinkhous y cols., 1968.
- 4.- ¿Qué cantidad de producto se requiere obtener?

Possibilidades:

 - a) Procedimientos a pequeña escala.
 - b) Procedimientos a gran escala.
- 5.- ¿ Con qué equipo y materiales se cuenta?

Los pasos a seguir son:

 - a) Revisar primeramente que equipo y materiales son usados en los procedimientos.

b) Con qué equipo y materiales se cuenta ?

c) Adquirir el equipo y materiales faltantes

6.- ¿Qué uso se le quiere dar al concentrado?

Posibilidades:

a) Uso clínico

b) Uso no clínico (Investigación)

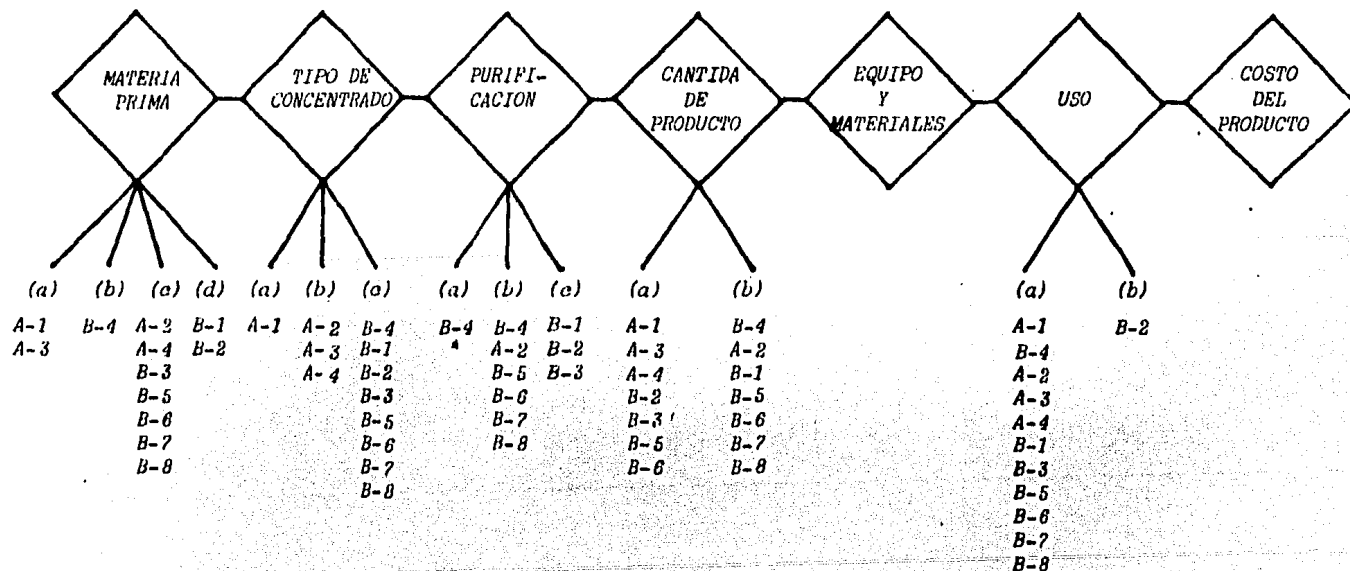
7.- ¿Cuál es el costo de manufactura del producto deseado?

Una vez contestadas todas y cada una de las preguntas antes mencionadas, la elección del o los métodos o parte de ellos y sus posibles combinaciones se facilitará.

En el cuadro No. II se observan los 7 puntos a cubrir para la elección del método, relacionando éstos con las técnicas mencionadas en la parte modular del presente trabajo. Esto con la finalidad de facilitar la rápida y fácil elección del método más conveniente a cada interés particular.

C U A D R O No. I I

ELECCION DEL METODO



A-1: 125 U/bolsa
 A-3: 89.7 U/orio
 A-4: 129.1 U/bolsa

E. TRATAMIENTO

Desde hace muchos años se viene usando provechosamente los productos sanguíneos humanos para el tratamiento de diversas afecciones hemorrágicas. El empleo de sangre entera o plasma fresco tiene limitaciones que obedecen a su escasa eficiencia, su volumen y su precio elevado, pero al hacerse disponibles las preparaciones a base de factores de la coagulación se han desarrollado métodos más efectivos para el tratamiento de la hemofilia A (O.M.S., Ginebra 1982; Triginer J. y cols., 1979).

A continuación presento una revisión de los productos comunmente usados en el tratamiento de la hemofilia A.

- La sangre fresca, cuyas ventajas en su administración son: una hemostasia mejor, dado que se administran hematies y plaquetas; fácil y obligada administración para la reposición del volumen en la hemorragia si ésta se ha producido (O.M.S., Ginebra 1982; Urbaniek S.J., -- 1977). Como desventajas: necesidad de donantes compatibles, riesgo de sensibilizaciones, peligro de sobrecarga circulatoria, inyección innecesaria de otros componentes, baja concentración de factor VIII y transmisión de enfermedades (O.M.S., Ginebra 1982; Urbaniek S.J., -- 1977; Triginer J. y cols., 1979; Leavell B.S. y Thorup D.S., 1978).

- El plasma, cuyas ventajas son: rapidez de obtención en estado congelado, menor dependencia del grupeje (O.M.S., Ginebra 1982). Inconvenientes: peligro por sobrecarga circulatoria, pérdida de actividad durante la separación, inyección innecesaria de otras fracciones, -- concentración baja del factor VIII, reacciones alérgicas y transmisión de enfermedades (O.M.S., Ginebra 1982; Rizza C.R., 1977; Leavell B.S. y Thorup D.A., 1978; Kasper C.K., 1975).

Los crioprecipitados y los concentrados del factor VIII son ambos útiles para la terapia de sustitución en enfermos de hemofilia A (O.M.S., -- Ginebra, 1982; Burks E.R., 1975).

- Los crioprecipitados contienen además del factor VIII, factores de -- Von Willebrand y fibrinógeno en cantidades suficientes para compensar su carencia. Por otro lado, el factor VIII se puede emplear para detener hemorragias en personas con enfermedad de Von Willebrand o -- insuficiente fibrinógeno plasmático (O.M.S., Ginebra, 1982).

Si bien los crioprecipitados se aplican en cantidades mayores y se requiere más tiempo para prepararlos y administrar las infusiones, que en el caso de los concentrados, su rendimiento (30 - 45 %) y menor costo de elaboración son ventajosos (O.M.S., Ginebra, 1982).

En la actualidad el crioprecipitado se usa fundamentalmente en el tratamiento de pequeños accidentes hemorrágicos, hemartrosis, hematomas musculares, también pueden ser usados en la terapia en casa (Pool J.G. en Brinkhous, 1975), etc., mientras que para la práctica cirúrgica, en que se deberán utilizar dosis del orden de 5,000 a 6,000 unidades diarias, el volumen de crioprecipitados sería excesivo y se prefiere el uso de concentrados de factor VIII (O.M.S., Ginebra 1982; Trigriner J. y cols., 1979). Desventajas: reacciones alérgicas, gran cantidad de material incompatible (ABO) que puede causar hemólisis (O.M.S., Ginebra, 1982; Urbaniak S.J., 1977).

Los concentrados de factor VIII sumamente purificados de que se dispone desde hace más de 10 años reúnen las cualidades siguientes: su actividad es conocida, solo necesitan volúmenes pequeños de líquidos para reconstituirlos y para lograr su acción terapéutica, su alto grado de pureza puede estar asociado con una incidencia menor a las reacciones secundarias inmediatas (efectos anafiloides o febriles además de transmisión de agentes infecciosos); son de fácil almacenamiento, manipulación y administración, permitiendo al paciente tratarse en su propia casa, este aspecto es discutido ampliamente en *Management of the Hemophilias A System for Home Treatment*, 1976; útil en el tratamiento de pacientes con presencia de inhibidores del factor VIII (O.M.S., Ginebra, 1982; Kasper C.K., 1975; Leavell B.S. y Thorup U.A., 1978; Urbaniak S.J., 1977; Brinkhous K.M., 1975; Levine P.M., y cols., 1973; Shanbrom E. y cols., 1971; Webster W.P., 1965; Brinkhous K.M. y cols., 1968). Todas las ventajas antes mencionadas hacen que los concentrados convengan más que los crioprecipitados para el autotratamiento domiciliario. No obstante, la amplitud de su uso está limitada por factores de índole económico y, en algunos países, por restricciones a su importación (O.M.S., Ginebra, 1982). Los efectos a largo plazo por el uso de preparaciones de factor VIII son:

estimulación a la creación de antígenos contra el factor VIII después de varias infusiones, transmisión de Hepatitis vírica, hemólisis derivada de la presencia de isoaglutininas de los grupos sanguíneos, creación de inmunoglobulinas antiinmunoglobulinas provocado por la inyección repetida de inmunoglobulinas que se encuentran en todas las preparaciones de AHF (D.M.S., Ginebra, 1982; Leavell B.S. y Thorup O.A., 1978; Brinkhous K.M., 1968; Rizze C.R., 1977; Kasper C.K., 1975), además, del alto costo y bajo rendimiento (Burke E.R., 1975).

Como se puede observar, los productos de mayor uso por sus características son los crioprecipitados y los concentrados liofilizados de factor -- VIII.

F. PRUEBAS DE COAGULACION

Las técnicas usadas en los diferentes métodos de obtención de factor antihemofílico descritos aquí, para la determinación de la concentración de factor antihemofílico humano se menciona a continuación:

Pruebas de Coagulación	Métodos en los que se empleó
Pool y Robinson, 1959	B-4
Eiggs y cols., 1955	A-3
Langdell y cols., 1953	B-1, B-2, B-3, B-8
Proctor y Rapaport, 1961	B-2, B-5, B-7

Un comentario final es necesario pronunciar con respecto a la actividad del factor antihemofílico reportada en estos métodos. Esta depende de gran cantidad de variables, a mencionar entre otras: limpieza del material (basta una cantidad insignificante de jabón, detergente o cromato para inhibir considerablemente el mecanismo de coagulación), obtención y preparación de la muestra (es esencial evitar la contaminación accidental de la muestra con sustancias que no existan en el plasma, inhibir eficazmente el mecanismo de coagulación y conservar en forma adecuada los factores lábiles), la interpretación de la lectura del punto final, la temperatura de almacenamiento del plasma normal o sustrato, los reactivos y las técnicas diferentes que son utilizadas (Manual Hyland sobre Pruebas de Coagulación; Kirkwood T.B.C. y cols., 1977; Elodi S. y cols., 1978).

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

El trabajo que aquí concluye titulado Revisión Bibliográfica de los Métodos de Obtención del Factor Antihemofílico, presenta 4 diferentes -- técnicas para crioprecipitados (A-1 a A-4) y 8 para concentrados de factor VIII humano (B-1 a B-8), enfocados a la actividad coagulante. -- Siendo las primeras técnicas de los años 1975, 1968 y las últimas de los años 1983, 1984 para crioprecipitados y concentrados respectivamente. Con lo antes mencionado, se cubre el objetivo primario de la presente tesis.

En el primer capítulo, Generalidades, se mencionan dos importantes acontecimientos en el tratamiento de la Hemofilia A. El primero, es el descubrimiento de que en la Hemofilia A una proteína (F - VIII) era deficiente o no existía en absoluto y que podía ser reemplazada con sangre fresca o plasma. El segundo acontecimiento fue la organización, poco después de la Segunda Guerra Mundial, de los servicios de transfusión de -- sangre. Investigaciones posteriores encontraron que el factor VIII se disociaba en una fracción de bajo peso molecular, que conservaba la actividad coagulante, y otra de alto peso molecular, que era portadora de las actividades del antígeno relacionado al factor VIII y el factor de Von-Willebrand. Existen grandes controversias acerca de las relaciones que guardan estas tres entidades entre sí, algunos autores consideran que -- son tres aspectos funcionales de una misma molécula, mientras que otros creen que se trata de tres moléculas distintas y para los restantes se trata de un complejo molecular. Tampoco existe un acuerdo general respecto al peso molecular del factor VIII (actividad coagulante), encuentran doses que varía entre 100,000 y 365,000 .

En el segundo capítulo, Métodos de Obtención del factor VIII, se presentan separadamente las técnicas para la obtención de crioprecipitados y concentrados de factor VIII. Para los primeros se suele utilizar como materia prima donaciones simples de sangre. Se pueden utilizar los crioprecipitados individuales o reunirse para aumentar la cantidad de unidades administradas. Se ha encontrado que entre otros factores, los siguientes, incrementan el rendimiento y la pureza del producto: el uso de plasma -- fresco, la recolección del plasma en CPD como anticoagulante, el descongelamiento rápido y la adición de PEG. Además, los crioprecipitados deriva-

dos del grupo sanguíneo "A" contienen más actividad de factor VIII que los del grupo "O". Por lo que respecta a los concentrados, las materias primas que se suelen utilizar son los crioprecipitados o directamente el plasma. Las etapas claves o recomendaciones de cada método son presentadas en el Cuadro No. I .

En la sección, Discusión General, se presentan los objetivos individuales, un resumen de las técnicas y los resultados más relevantes. Haciendo énfasis en las etapas claves o recomendaciones anotadas en el Cuadro -- No. I , las cuales son el resultado del análisis de cada método y pueden ser tomadas en cuenta, entre otros casos, para enriquecer la metodología de alguna técnica en particular o para diseñar nuevos procesos. Como un segundo resultado colateral al objetivo primario de esta tesis y apoyado en los comentarios presentados en la parte de Resultados y Tratamiento, es factible concluir que todas y cada una de las técnicas presentadas son de utilidad práctica y que la elección de alguna de ellas dependerá básicamente de lo que se desee o de lo que se disponga. Con el propósito de facilitar la rápida elección del método que más convenga a cada interés en particular, diseñé el Cuadro No. II, el cual está estructurado en base a la respuesta a siete preguntas básicas, las cuales se presentan en la sección correspondiente, relacionadas éstas con las técnicas mencionadas en la parte medular de este trabajo.

R I B L I O G R A F I A

- Abildgaard C.F., et al.: Treatment of Hemophilia with Glycine-Precipitated Factor VIII. *New Eng. J. Med.* 275:471-475 (1966).
- Austen D.E.G.: Estructura y Función de los Factores VIII y IX, pp. 31/54, - en Rizza C.R.: *Clinica Hematológica* (1980).
- Biggs R., et al.: The Assay of Antihemophilic-Globulin Activity. *Br. J. Haemat.* 1:20 (1955).
- Brinkhous K.M.: Development and Present Status of Concentrate Therapy -- for Hemophilia and von Willebrand's Disease. *Wien. Klin. Wochenschrift* 19:509-514 (1982).
- Brinkhous K.M. and Hemker H.C.: *Handbook of Hemophilia*, pp. 475/492, *Excerpta Medica*, Amsterdam. American Elsevier Publishing Company 1975.
- Brinkhous K.M., et al.: A High Potency Glycine-Precipitated Antihemophilic Factor Concentrate, Use in Hemophilia With Inhibitors. *Blood the Journal of Hematology.* 30:855 (1967).
- Brinkhous K.M., et al.: A New High-Potency Glycine-Precipitated Antihemophilic Factor (AHF) Concentrate. *JAMA* 205:67 (1968).
- Burka E.R., et al.: A Protocol for Cryoprecipitate Production. *Transfusion* 15:307 (1975).
- Burka E.R., et al.: The Unsuitability of Outdate Blood for Making Therapeutically Effective Cryoprecipitate. *Transfusion* 13:412 (1973).
- Chavin S.I.: Factor VIII: Structure and Function in Blood Clotting. *American Journal of Hematology* 16:297 (1984).
- Cohn E.J., et al.: A System for Separation of the Components of Human Blood, Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma. *J. Am. Chem. Soc.* 72:465 (1950).

- Davie E.W. and Fujikawa K.: Basic Mechanisms in Blood Coagulation. Ann. -- Rev. Biochem. 44:799 (1975).
- Elödi S., et al : Some Sources of Error in the One-Stage Assay of Factor VIII. Hemostasis 7:1 (1978).
- Gorman J.J. and Ekert H.: Studies on the Structure and Subunit Composition of Human Antihemophilic Factor. Trombosis Research 12:341 (1978)
- Gunson H.H.: Variables Involved in Cryoprecipitate Production and their on Factor VIII Activity. British Journal of Haematology 43:287 (1979).
- Hershgold E.J.: Properties of Factor VIII (Antihemophilic Factor). Prog. Hemostasis Thromb. 2:99 (1974).
- Hershgold E.J., et al : The Potent Antihemophilic Globulin Concentrate Derived from a Cold Insoluble Fraction of Human Plasma: Characterization and Further Data on Preparation and Clinical Trial. J. Lab. Clin. Med. 67:23 (1966).
- Horowitz B., et al : Preparation of Antihemophilic Factor and Fibrinogen from Human Plasma Cryoprecipitate. Transfusion 24:357 (1984).
- Ingram G.I.C.: The History of Haemophilia. J. Clin. Pathology 29:3 (1976)
- Jackson C.M.: Blood Coagulation. Ann. Rev. Biochem. 49:765 (1980).
- James M.L. and Wickerhauser M.: Development of Large-Scale Fractionation Methods. Vox Sang. 23:402 (1972).
- Johnson A.J., et al : Preparation of and Clinical Experience with Antihemophilic Factor Concentrates. 35:49 (1968).
- Johnson A.J., et al : Enhanced Yield of Antihemophilic Factor and von Willebrand Factor by Cryoprecipitation with Polyethylene Glycol. Vox --- Sang. 36:72 (1979).

- Johnson A.J., et al :Preparation fo the Major Plasma Fractions by Solid-Phase Polyelectrolytes.J. Lab. Clin. Med. 92:194 (1978).
- Johnson A.J., et al :Two Large-Scale Procedures for Purification of Human Antihemophilic Factor (AHF).Blood J. Hematology 28:1011 (1966).
- Jones P., Hemofilia, Cuadernos de Documentación del SEREM, Madrid 1978.
- Kasper C.K.: Hematologic Care, in Boone D.C. (Editor): Comprehensive Management of Hemophilia, Los Angeles California 1975.
- Kirkwood T.B.L., et al :Identification of Sources of Inter-Laboratory -- Variation in Factor VIII Assay. British Journal of Haematology 37:559 (1977).
- Langdell R.D., et al :Effect of Antihemophilic Factor on One-Stage Clotting Tests. J. Lab. Clin. Med. 41:637 (1953).
- Leavell B.S. y Thorup O.A., Hematología Clínica, Editorial: Interamericana Cuarta Edición, pp.514-671, 1978.
- Legaz M.E., et al :Isolation and Characterization of Human Factor VIII - (Antihemophilic Factor). Journal of Biological Chemistry 248:3946 --- (1973).
- Levine P.H. and Britten A.F.H.: A Study of 45 Patients with Hemophilia A and B. Ann. of Internal Medicine 78:195 (1973).
- Liu D.T.H., et al :An Improved Method for the Preparation of Intermediate-Purity Antihemophilic Factor Concentrate for Therapeutic Usage. Vox San. 38:216 (1980).
- Lopaciuk S., et al :Separation of Human Antihemophilic Factor (AHF, Factor VIII) from Fibrinogen by Means of Defibrase. Folia Haematol 102: - 671 (1975).

Lowe G.D.O. and Forbes C.D.: Las Alteraciones Congénitas de la Coagulación y el Diagnóstico en el Laboratorio, pp. 82/99, en Rizza C.R.: Clínica Hematológica (1980).

Management of the Hemophilias A System for Home Treatment, Jeanty L. and Vreker R.A. (Edts), Scandinavian Journal of Haematology supplementum - No. 31 (1976).

Manual Hyland Sobre Pruebas de Coagulación, Hyland Laboratories.

Marqués G.F., y cols.: Artropatía Hematológica Fisiopatológica y Tratamiento. Edita Travenol S.A., Valencia 1981.

Mason E.C.: Thaw-Siphon Technique for Production of Cryoprecipitate Concentrate of Factor VIII. The Lancet ii:15 (1978).

Montove J.E. et al : Prepooled Cryoprecipitate for Treatment of Hemophilia A. Transfusion 23:265 (1983).

Newman J. et al : Methods for the Production of Clinically Effective Intermediate and High-Purity Factor-VIII Concentrates. British Journal of Haematology 21:1 (1971).

Organización Mundial de la Salud: Toma, Fraccionamiento, Inspección de Calidad y Usos de la Sangre y los Productos Sanguíneos: Indicaciones y Contraindicaciones del Uso de Concentrados de Factores de la Coagulación. pp. 36/49 Ginebra 1982.

Polson A., et al : The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight. Biochimica et Biophysica Acta 82:463 -- (1964).

Pool J.G.: Cryoprecipitate Quality and Supply. Transfusion 15:305 (1975).

Pool J.G. and Robinson J.: Assay of Plasma Antihaemophilic Globulin (AHG) British Journal of Haematology 5:17 (1959).

- Pool J.G.:Cryoprecipitate:its Preparation and Clinical Use,in Brinkhouse K.M. and Hemker H.C.:Handbook of Hemophilia,pp.487/492 (1975).
- Poon M.C. and Retnoff O.D.:Evidence that Functional Subunits of Antihemophilic Factor (Factor VIII) are Linked by Noncovalent Bonds.Blood - 48:87 (1976).
- Proctor R.R. and Rapaport S.I.:The Partial Thromboplastin Time with K_{eg} lin.Am. J. Clin. Pathology 36:212 (1961).
- Rizza C.R.:Clinical Management of Haemophilia.Br. Med. Bull 33:225 ---- (1977).
- Rocha E. y cols.:Síntesis,Bioquímica y Estructura molecular del Factor VIII.Sangre 23:642 (1978).
- Sgouris J.T. and Wickerhauser M.:Use of Frozen Cryoprecipitate for the Preparation of Clinical Factor VIII Concentrate.Transfusion 13:399 -- (1973).
- Shanbrom E.et al :Modern Treatment of Hemophilia with a Potent,New AHF Concentrate.Bibliotheca Haematologica,No. 38 pp. 854/860 (1971).
- Shapiro S.S.:The Immunologic Character of Acquired Inhibitors of Antihemophilic Globulin (Factor VIII) and the Kinetics of their Interaction with Factor VIII.Journal of Clinical Investigation 46:147 (1967)
- Slichter S.J.,et al :Preparation of Cryoprecipitated Factor VIII Concentrates.Transfusion 16:616 (1976).
- Smith J.K.,et al :A Factor VIII Concentrate of Intermediate Purity and Higher Potency.Transfusion 19:299 (1979).
- Stavridis J.C. and Voriais N.J.:The Role of Ca in "Activation"of F-VIII Molecule.Thrombosis Research 15:689 (1979).

- Switzer M.E.P., et al : Is There a Precursive, Relatively Procoagulant-
Inactive Form of Normal Antihemophilic Factor (Factor VIII)? Blood --
54:916 (1979).
- Thomas K.B., et al : Fast Migrating Protein, Immunochemically Related to -
Human Factor VIII, Studied by Crossed Immunoelectrophoresis in Agarose
British Journal of Haematology 54:221 (1983).
- Tomasulo P.A., et al : Preselection of Donors to Improve the Quality of -
Cryoprecipitate. American Journal of Hematology 8:191 (1980).
- Triginer J., et al : Técnicas de Obtención de Factor Antihemofílico VIII
y IX y sus Aplicaciones Clínicas. Sangre 24:937 (1979).
- Urbaniak S.J. and Cash J.D.: Blood Replacement Therapy. Br. Med. Bull ---
33:273 (1977).
- Vermeer C., et al : Contributions to the Optimal Use of Human Blood. Vox -
Sang. 31:55 (1976).
- Wagner R.H., et al : Purification of Antihemophilic Factor (Factor VIII)-
by Amino Acid Precipitation. Thromb. Diath. Haemorrh. 11:64 (1964).
- Wagner R.H., et al : Glycine-Precipitated Antihemophilic Factor Concentra-
tes and Their Clinical Use. Thromb. Diath. Haemorrh. 35:41 (1968).
- Webster W.P., et al : Clinical Use of a New Glycine-Precipitated Antihem-
philic Fraction. Amer. J. Med. Sci. 250:643 (1965).
- Wensley R.T. and Snape T.J.: Preparation of Improved Cryoprecipitated --
Factor VIII Concentrate. Vox Sang. 38:222 (1980).
- Wickerhauser M.: Preparation of Antihemophilic Factor from Indated Plas-
ma. Transfusion 16:345 (1976).

Wickerhauser M., et al :Development of Large-Scale Fractionation Methods
Vox. Sang. 35:19 (1978).

Wintrobe M.M., et al, Clinical Hematology, Lea and Febiger (Edts.), Seventh
Edition 1974, Reprinted 1975, 1976.