

200520

19 N



P A T E N T E  
D E  
I N T R O D U C C I Ó N

por "PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN LOS METODOS PARA LA OBTENCION DE ENZIMAS, ESPECIALMENTE DE LA HIALURONIDASA", a favor de las firmas: VISMARA TERAPEUTICI, VISTER, de Italia -Casatenovo Brianza- Como - y DROGAS, VACUNAS Y SUEROS, S.A., de Barcelona, Rda. S. Antonio, 60.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente patente de introducción se refiere a unos perfeccionamientos introducidos en los métodos para la obtención de enzimas, especialmente de la hialuronidasa.

Es sabido que la acción biológica de los fermentos tiene un límite máximo a una temperatura relativamente baja, por cuyo motivo es extremadamente difícil la obtención de preparados enzimáticos absolutamente libres de gérmenes vivos, ya que el más suave de los procedimientos de esterilización conocidos hasta la fecha, cual es la calefacción discontinua a la temperatura de 60<sup>o</sup>-65<sup>o</sup>C., corrientemente conocida con la denominación técnica de "tyndalización", inactiva notablemente las propiedades fermentativas de los citados preparados enzimáticos.

Este inconveniente que, de ordinario, no tiene la menor trascendencia cuando se trata de la obtención de prepara

200520



dos que no se administran por vía parenteral, revisten una importancia extraordinaria cuando el fermento en cuestión es ta destinado a formar parte de una especialidad inyectable.

Particularmente, en el caso de la hialuronidasa,

5. de la que, como es sabido, es corriente el explotar sus proiedades facilitadoras de la difusión de líquidos en el organismo, a los cuales es adicionada en el momento de su inyección, es necesario poder obtener el enzima con una garantía absoluta en lo que respecta a su esterilidad, ya que por la
10. feferida acción difusora, los mismos gérmenes que la contaminasen, por un lado la inactivarían y, por otro, darían lugar al correspondiente proceso séptico que se difundiría rápidamente.

15. Actualmente, la técnica para la preparación de la hialuronidasa, al objeto de presentarla bajo fórmulas farmacéuticas de uso corriente, están restringidas por dos dificultades principales: La primera de éllas estriba en la inestabilidad de la enzima en solución acuosa. En esta forma pierde rápidamente sus características biológicas, lo cual
20. obliga a preparar la solución poco antes de su aplicación, siguiendo técnicas sépticas apropiadas que, las más de las veces, no hacen más que complicar los métodos operatorios de su suministro. Por el contrario, es sabido que el enzima puro, en estado completamente seco, conserva casi indefinidamente sus propiedades biológicas, pero, no obstante, cuando se trata de su esterilización térmica, estas propiedades resultan igualmente anuladas por las mismas razones expuestas anteriormente.
- 25.

30. Así, pues, el problema reside en encontrar un procedimiento perfeccionado para la obtención de enzimas de la

200520



clase citada, que permita llevar a cabo esta esterilización sin menoscabo de las propiedades biológicas originales que son la característica principal del preparado en cuestión.

5. Se ha tratado de aumentar la resistencia al calor de dichas enzimas, por diversos procedimientos, sin que, hasta la fecha, los resultados hayan sido dignos de tenerse en consideración.

10. No obstante, el solicitante, siguiendo sus experiencias, ha encontrado que ciertos compuestos salinos, al ser adicionados al compuesto enzimático en vías de preparación, en proporciones adecuadas y ante cuya presencia se hace desenvolver parte del proceso operatorio para su obtención, tienen cierta tendencia a aumentar esta resistencia.

15. De entre los diversos compuestos salinos capaces de aumentar la citada resistencia a la esterilización térmica de la hialuronidasa, se ha encontrado como más ventajoso el empleo del sulfato de amonio, y en los ensayos llevados a cabo en este sentido, se ha encontrado que una proporción del 50% de este producto en el enzima en cuestión, permite su esterilización térmica hasta la temperatura de 100°C., sin que su actividad biológica sea prácticamente afectada.

20. Por otra parte, el sulfato de amonio ya se encuentra presente en la técnica operatoria para la obtención de la hialuronidasa, mediante la cual ésta es extraída del testículo de toro en solución diluida de ácido acético. En efecto, siguiendo esta técnica, el citado extracto es precipitado por la adición de sulfato de amonio hasta la saturación, seguida de fraccionamiento en alcohol y precipitación subsiguiente con nuevas adiciones del mismo compuesto salino

25. y, finalmente, de una operación de diálisis destinada a la

30.

200520



purificación del compuesto resultante. Ensayando diversas fracciones con contenidos diferentes de sulfato de amonio, tomadas durante el citado proceso de diálisis, se ha encontrado que poseen las mismas características de resistencia encontradas para la hialuronidasa adicionada del citado compuesto salino independientemente.

5.

En consecuencia, de acuerdo con la presente invención, los perfeccionamientos introducidos en los métodos de obtención de los enzimas de la clase especificada anteriormente, comprenden un proceso de purificación por diálisis, del cual se toman únicamente las fracciones de hialuronidasa que, por análisis, revelan un contenido de, aproximadamente 50% de sulfato de amonio.

10.

Las fracciones cuyo contenido salino es diferente del citado pueden ser, eventualmente, corregidas hasta obtener el valor óptimo anterior, mediante nuevas adiciones de sulfato de amonio o de fracciones de menor contenido, según los casos.

15.

De esta manera se hace posible la preparación de una hialuronidasa en forma de polvo estable, especialmente apta para ser esterilizada a temperaturas de hasta 100°C., susceptible de ser envasada en frascos de vidrio con tapón esmerilado o de caucho. En estas condiciones, como sea que la dosis terapéutica corriente según la cual se suministra la hialuronidasa es de 2 a 4 miligramos, resulta que la cantidad de sal suministrada es de alrededor de 1 a 2 mg. por dosis, lo cual no tiene ninguna importancia terapéutica práctica.

20.

25.

La invención, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras variantes de realización que difieran en detalle de la indicada únicamente a título de ejemplo.

30.

200520



5. plo ilustrativo para la precedente descripción, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, ser realizada empleando los aparatos y dispositivos más adecuados a cada caso, combinándolos del modo más conveniente para el logro del fin propuesto: por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

N O T A

Hecha la descripción del presente invento, lo cual se declara como no divulgado ni practicado en España, comprende las siguientes reivindicaciones:

10. 1ª.- Perfeccionamientos en los métodos para la obtención de enzimas, especialmente de la hialuronidasa, que comprenden una fase de esterilización térmica discontinua, caracterizados porque dicha esterilización se lleva a cabo en presencia de un 40 a 60% de un compuesto salino, para
15. substancialmente reducir la pérdida de actividad biológica del enzima ocasionada por dicha esterilización.
20. 2ª.- Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizados porque como compuesto salino destinado a reducir dicha pérdida de actividad, entra en consideración el sulfato de amonio.
25. 3ª.- Perfeccionamientos en los métodos para la obtención de enzimas, especialmente de la hialuronidasa que comprenden al menos, una fase de precipitación del extracto por medio de sulfato de amonio y una operación de diálisis previas a la esterilización térmica discontinua, caracterizados

200520



porque dicha operación de diálisis se lleva a cabo de manera que, durante su desarrollo, se toman las fracciones de enzima que contienen aproximadamente un 5% de sulfato de amonio, para su ulterior esterilización.

5. 4<sup>a</sup>.- Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizados porque dicha esterilización térmica discontinua, se lleva a cabo mediante temperaturas comprendidas entre 65 y 110<sup>o</sup>C.

10. 5<sup>a</sup>.- Perfeccionamientos de acuerdo con la reivindicación 3<sup>a</sup>, caracterizados porque el contenido en sulfato de amonio de las fracciones de título diferente a 50% se corrigen por adiciones ulteriores de compuesto salino, o de fracciones de título inferior, según los casos.

15. 6<sup>a</sup>.- Perfeccionamientos introducidos en los métodos para la obtención de enzimas, especialmente de la hialuronidasa.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de seis hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

20. Madrid, a 19 de noviembre de 1951.-

P.a.

JOSE SERN NIZALLES