

229568

P.- 14.811.-

"Urokinase"



24

229568

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de LÖVENS KEMISKE FABRIK VED A. KONGSTED, entidad danesa, establecida en 19, Brønsbøjej, Copenhague, Dinamarca, por:

"UN METODO PARA LA RECUPERACION DE UROQUINASA EN UNA FORMA MUY CONCENTRADA A PARTIR DE LA ORINA HUMANA"

Este invento se refiere a un método para la recuperación de uroquinasa en una forma muy concentrada a partir de la orina humana. La uroquinasa se conoce también como el activador del plasminógeno en la orina e como el activador fibrinolítico en la orina.

5



Se ha descubierto que las soluciones de concentrado de uroquinasa, producidas mediante el método de acuerdo con el invento, pueden administrarse en inyección intravenosa a los seres humanos, sin provocar reacciones perjudiciales y que mediante tales inyecciones es posible disolver los coagulos de fibrina y combatir la tromboflebitis.

El método de acuerdo con el invento se caracteriza por que una solución impura de uroquinasa, obtenida por elución de un sistema adsorbido producido mediante el contacto de la orina humana con un adsorbente, se pone en contacto con partículas de una resina sintética cambiadora de catión que contenga una cantidad considerable de grupos carboxilo y que se ha tratado previamente con una solución acuosa que tenga un pH entre 5 y 7,5 y una concentración catiónica entre 0,1 y 1 equivalentes -gramo/litro, en una cantidad tal y durante un período de tiempo tal, que se haya alcanzado prácticamente el equilibrio entre la citada solución y la resina, y el sistema adsorbido así obtenido se eluye con una solución acuosa de un electrolito que tenga un pH tal que el eluato resultante se obtenga con un pH entre 5 y 11.

Mediante esta adsorción y elución se obtiene una purificación particularmente completa de la uroquinasa, si la solución de electrolito utilizada en la elución tiene un pH, o una concentración catiónica, o un pH y una concentración catiónica, que sea superior que aquella o aquellas de la solución con la que la resina se puso en equilibrio.

229568



74.11"

Puesto que la cantidad de solución impura de uroqui-
nasa puesta en contacto con la resina es comparativamente
pequeña, debido a la adsorción anterior directamente de
la orina, el pH de la solución puesta en contacto con la
resina se determinará por el pH de la solución con la que
se ha tratado la resina antes de la adsorción.

Es particularmente conveniente preparar la citada so-
lución impura de uroquinasa a partir de orina, ajustando
el pH de la orina a un valor entre 3 y 8, preferentemente en-
tre 6 y 8, poniendo en contacto la orina con partículas de
gel de sílice o un silicato cambiador de catión, y eluyen-
do el sistema adsorbido así obtenido con una solución acuosa
que tenga un pH tal que el aluato resultante se obtenga
con un pH entre 9 y 11,5. Para dicha elución son muy ade-
cuadas las soluciones acuosas de amoníaco diluidas.

El término "gel de sílice" aquí empleado se preten-
de aplicar a los productos más o menos finamente granula-
dos, obtenidos tratando soluciones de silicatos de metales
alcalinos con ácidos, y mediante lavado y secado del ácido
silícico coloidal así formado. Entre los silicatos cambia-
dores de catión pueden mencionarse las zeolitas artificia-
les, utilizadas en los procesos de cambio de catión para
ablandar aguas, por ejemplo, las "permutitas", es decir, si-
licatos de aluminio y sodio que contienen agua, que pueden
obtenerse por fusión de una mezcla de dióxido de silicio,
caolín y carbonato sódico o por vía húmeda.

La adsorción de gel de sílice, silicatos cambiado-



res de catión y las resinas antes descritas, y la posterior elución del sistema adsorbido así obtenido, se llevan a cabo preferentemente haciendo pasar la solución que contiene uroquinasa, y a continuación la solución de elución, a través de una columna formada de partículas del adsorbente y contenidas en un tubo. Cuando se eluye una columna usada para la adsorción directamente de la orina, no es necesario, aunque es preferible, recoger el eluato en fracciones y despre-
5
preciar las fracciones que contienen cantidades despreciables de uroquinasa. Al eluir una columna de la resina para
10
la segunda adsorción es necesario, con objeto de obtener un producto suficientemente puro, recoger el eluato en fracciones y reunir las fracciones que contengan la parte principal de la uroquinasa.

15
Para la adsorción directa de uroquinasa a partir de la orina, pueden utilizarse también otras sales insolubles distintas de los silicatos cambiadores de catión, preferentemente en forma de precipitados. Es sabido, por ejemplo, que el sulfato bórico (von Kaula, J. lab. clin, med.
20
vol. 14, página 944 (1954)) y el fosfato cálcico (Iundquist y col., Bioch, J., vol. 59, página 69 (1955)), pueden utilizarse con este objeto. Además, se ha descubierto ahora que la oxixelulosa puede utilizarse también para la adsorción directa de uroquinasa a partir de orina a valores del pH
25
entre 3 y 7 y que las soluciones acuosas que tienen un pH entre 8 y 11 son adecuadas para eluir el sistema adsorbido así obtenido. Cuando se utilizan como adsorbentes las citadas sales insolubles o la oxixelulosa, es preferible mezclarlas con la orina en una vasija provista de agitador durante

229568



un período de tiempo suficiente y después de ello separar la orina del producto adsorbido, por ejemplo por filtración.

5 Con objeto de facilitar la segunda operación de adsorción y la elución, es conveniente, antes de las mismas, concentrar la solución obtenida por elución del producto absorbido, preparado directamente de la orina, a un volumen menor del 10%, preferentemente menor del 5%, del volumen del citado eluato, mediante precipitación y redisolución de la uroquinasa, o mediante un secado por congelación de la solución y redisolución del producto seco, o por ambos métodos en combinación.

15 La citada precipitación puede efectuarse preferentemente ajustando el pH de la solución a un valor por debajo de 4, preferentemente entre 1 y 2, y añadiendo una de las sales empleadas ordinariamente para la precipitación de proteínas, por ejemplo cloruro sódico o sulfato amónico, a la solución en tal cantidad que precipite la uroquinasa. Una precipitación prácticamente completa requerirá en general que la solución se sature con sal más de un 50%. La precipitación puede efectuarse también por adición de un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo etanol, acetona o dioxano. Cuando se utiliza el etanol, una concentración final de 80% de etanol en volumen en la solución, determinará una precipitación sustancialmente completa de la uroquinasa.

20

25 Redisolviendo el precipitado obtenido por acidificación y precipitando con sal, el pH de la solución se ajusta a un valor entre 6 y 10, preferentemente entre 7 y 9.

220568



5 Mediante el secado por congelación de la solución obtenida en la última operación de elución, puede obtenerse fácilmente un producto que tiene un contenido en uroquinasa superior a 3000 unidades/mg, de las unidades que se definirán más adelante. Productos que posean un grado inferior de pureza no son recomendables para su empleo en inyección.

10 Antes de este secado del estado congelado, así como del secado del estado congelado realizado entre las dos operaciones de adsorción, es conveniente dializar la solución en agua, con objeto de separar prácticamente los electrolitos introducidos en las soluciones durante las operaciones precedentes.

15 Los contenidos de uroquinasa aquí indicados se determinaron por la siguiente modificación del método de disolución del coágulo, de Fletcher's (Fletcher, Biochem. J., vol. 56, pág. 677 (1.954)). En un tubo de 9 x 100 mm. se mezcla A) 0,5 ml de una solución amortiguadora de fosfato 0,1 molar, que tenga un pH-7,2, B) 0,01 a 0,1 ml de la solución de uroquinasa, C) 0,1 ml de una solución de trombina que
20 contenga 100 unidades NIH/ml, y D) 1,0 ml de una solución al 0,8% de fibrinógeno de buey. El tubo de ensayo se incuba a 37° C. Después de 1 minuto la solución se gelifica a un coágulo homogéneo y sobre la superficie del coágulo se coloca una bola de vidrio que tenga un diámetro de 7 mm. El tiempo de lisis se mide como el tiempo en el que la bola alcanza
25 el fondo del tubo, sin sacudirlo. Debido a las dificultades de conseguir fibrinógeno que tenga propiedades líticas reproducibles no puede definirse ninguna unidad sobre la ba-



se del ensayo de tiempo de lisis del coagulo, solamente. Por consiguiente, como referencia patrón se escogió un producto intermedio, escogido arbitrariamente, obtenido durante una operación empleando el método de acuerdo con el invento, indicando su actividad en unidades arbitra-
5 rias. Comparada con este patrón, la orina normal se encontró que contenía 5 de estas unidades por ml.

Para la orina, este método solamente dió resultados aproximados y, por consiguiente, para determinar el contenido de uroquinasa en la orina es preferible aplicar el método de placa de fibrina descrito por S. Müllerstz en Acta Physiologica Scandinavica, vol. 25, pág. 93 (1.952).
10

Ejemplo

A 300 litros de orina masculina normal se le añadió la cantidad necesaria de una solución de NaOH al 28% para ajustar el pH de la orina a 7,5. Con ello, se formó un precipitado voluminoso que no contenía uroquinasa. Este precipitado se separó de la orina por filtración.
15
A Través de una columna de gel de sílice de 7,6 x 63 cm se hicieron pasar 5 litros de ácido clorhídrico al 5%, 5 litros de agua, y 5 litros de una solución de NaCl al 10%, en el orden indicado. A continuación, la orina filtrada se hizo pasar a través de la columna a una velocidad de 500 ml por minuto. Con esto, se adsorbió sobre
20
25 el gel de sílice un 90% de la uroquinasa contenida en la orina, lo cual puede hallarse determinando el contenido

229568



de uroquinasa en la orina filtrada y en la orina que deja la columna, por medio del método de placa de fibrina anteriormente indicado. A continuación, la columna se lavó con agua y se eluyó a continuación con una solución de amoníaco acuoso al 4%, a una velocidad de 150 ml por minuto. Las primeras fracciones, algo amarillentas, de unos 2 litros, no contenían uroquinasa y se despreciaron. A continuación, se recogieron, con un rápido cambio del pH, unos 2 litros de un eluato parduzco que contenía un 70% de la uroquinasa de la orina. A este eluato se le añadió 20% de su peso de cloruro sódico sólido y se agregó ácido clorhídrico a la solución, hasta que su pH fué aproximadamente 1,5. Con ésto se formó un precipitado voluminoso que contenía toda la uroquinasa de la solución. El precipitado se separó de la solución por filtración y se disolvió en agua añadiendo una solución diluida de NaOH hasta pH aproximadamente 8. La sustancia sin disolver, principalmente ácido silícico, se separó de la solución por centrifugación y el líquido pardo rojizo que sobrenada se dializó durante la noche contra agua destilada. La solución dializada se secó por congelación, con lo que se obtuvieron 2-3 g de producto seco que tenía una actividad de 400-700 unidades/mg.

Como resina cambiadora de cation para la segunda operación de adsorción se utilizó "Amberlite IRC 50 (XE-97)", la cual se había obtenido de Rohm & Haas, Philadelphia, Penn. Esta resina se tamizó en un tamiz de malla 200, para separar las partículas más finas. Después de ésto, se trató según se describió por Hirs, Moore y Stein, J. Biol.

229568



Chem. vol 200, página 493 (1.953)) y a continuación se trató con una solución amortiguadora que contenía 5,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,5 g NaH_2PO_4 y 5,8 g de NaCl por litro. Esta solución tenía un pH 6,2 y una concentración catiónica de aproximadamente 0,23 equivalentes gramo por litro. De la resina tratada así previamente, se puso en suspensión en la misma solución amortiguadora la cantidad suficiente para formar una columna de 2x41 cm, y la suspensión se utilizó para rellenar un tubo cromatográfico y se dejó sedimentar por gravedad. Se escurrió el líquido en exceso y a continuación se hicieron pasar por la columna 4 g de uroquinasa bruta obtenida del secado por congelación, que se indicó anteriormente, disueltos en 40 ml de la citada solución tampón. Después de esto, la columna se lavó con 100 ml de la citada solución amortiguadora, con lo cual se separaron de la columna la mayor parte de las proteínas y del material coloreado. La columna se eluyó entonces con una solución de cloruro sódico 0,5 molar y el eluato se recogió en fracciones, determinando el contenido de uroquinasa en cada una de ellas. Las fracciones que contenían la parte principal de la uroquinasa se reunieron, se dializaron contra agua destilada y se secaron por congelación. Se obtuvieron con ello unos 150 mg. de uroquinasa que tenían una actividad de unas 10.000 unidades/mg.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 1 de Julio de 1.955, bajo el número 19168/55, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



-.-.-. N O T A .-.-.-

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1ª.- Un método para la recuperación de uroquinasa en una forma muy concentrada a partir de la orina humana, caracterizado porque una solución impura de uroquinasa, obtenida por elución de un producto adsorbido, producido poniendo en contacto orina humana con un adsorbente, se pone en contacto con partículas de una resina sintética cambiadora de
10 cación que contiene una cantidad considerable de grupos carboxílicos y que se ha tratado previamente con una solución acuosa que tenga un pH entre 5 y 7,5 y una concentración catiónica entre 0,1 y 1 equivalentes gramo/litro en tal cantidad y durante un período de tiempo tal que se alcance el
15 equilibrio entre dicha solución y la resina, y eluyendo el sistema adsorbido así obtenido con una solución acuosa de un electrolito que tenga un pH tal que el eluato resultante se obtenga con un pH entre 5 y 11.

20 2ª.- Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, caracterizado porque la solución del electrolito utilizada para la elución del producto adsorbido en la resina tiene bien un pH, o una concentración catiónica, o bien tanto un pH como una concentración catiónica que es superior a aquélla o a aquéllas de la solución con la que



se puso en equilibrio la resina.

5 3º.- Un método como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la solución impura de uroquinasa utilizada como material de partida se produce mediante un proceso que comprende las fases de ajuste del pH de la orina a un valor entre 3 y 8, el contacto de la orina con partículas de gel de sílice o un silicato cambiador de catión, y la elución del sistema adsorbido así obtenido con una solución acuosa que tenga un pH tal que el eluato resul-
10 tante se obtenga con pH entre 9 y 11,5.

15 4º.- Un método como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2 caracterizado porque la solución impura de uroquinasa utilizada como material de partida se produce mediante un proceso que comprende las fases de poner en contacto la orina con oxixelulosa a un pH entre 3 y 7 y la elución del sistema adsorbido así obtenido con una solución acuosa que tenga un pH entre 8 y 11.

20 5º.- Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la solución obtenida por elución del sistema adsorbido, obtenido directamente de la orina, se concentra, antes de la segunda fase de adsorción, hasta un volumen menor del 10%, preferentemente menor del 5%, del volumen del citado eluato, mediante precipitación y redisolución de la uroquinasa o mediante
25 secado del estado congelado de la solución y redisolución del producto seco, o por ambos métodos en combinación.

229568



62.- Un método para la recuperación de uroquinasa en una forma muy concentrada a partir de la orina humana.

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

5 Esta Memoria consta de once hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 24 JUL. 1956

P.A.

Alberto de Elizaburu
Perfumer