



233222

233222

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA

a favor de

THE NATIONAL DRUG COMPANY, Entidad norteamericana, domiciliada en PHILADELPHIA, Pa, Estados Unidos, 4663-85 Avenue,

por

" UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA COMPOSICION DE ENZIMA PROTEOLITICA ESTABLE "

Inventores: Miller Joseph Sullivan y Gustav Julius Martín, ambos norteamericanos.

(Prioridad de las Patentes norteamericanas Ser. 560.862, de 23 enero 1956 y 7 de enero de 1957)

/////

23 E



233222

5

10

15

20

25

30

Hace relativamente poco tiempo que se ha recomendado y utilizado la tripsina en casos de tromboflebitis y flebotrombosis agudas. Sin embargo, han surgido dificultades cuando las composiciones de tripsina se han administrado por vía parenteral. Así, se ha comprobado que la tripsina resulta relativamente inestable en solución acuosa y, por consiguiente, debe prepararse fresca inmediatamente antes de usarla. Además, se ha comprobado que en muchos casos la administración intramuscular de tripsina en solución acuosa, en solución isotónica acuosa o en suspensión oleaginosas, resulta a menudo considerablemente dolorosa al ser inyectada.

Se ha comprobado ahora que las composiciones de tripsina que contienen gelatina acuosa, son mucho más estables y, como consecuencia, reducen en gran medida el dolor que antes se notaba en la inyección. Aun cuando no deseamos ligarnos a ninguna teoría, quizá la reducción del dolor se debe al hecho de que la tripsina asimila la gelatina con preferencia a los tejidos afectados durante la inyección y, de este modo, reduce considerablemente el factor dolor. Además, quizá la presencia de polipéptidos origina un cambio del equilibrio entre la tripsina activa e inactiva y, como resultado, una mejora en la estabilidad. Esto último es considerablemente importante, pues es sabido que la actividad de la tripsina se reduce rápidamente en un medio acuoso.

Se ha comprobado también que las enzimas proteolíticas en general son estabilizadas por dicha combinación con gelatina acuosa. El término "enzima proteolítica" es utilizado aquí para significar que incluye tripsina per se, así como las enzimas proteolíticas afines, tales como qui-



23 E 1953

233222

motripsina, pepsina y bromelin y también estreptoquina. La tripsina y la quimotripsina son preferidas para ser utilizadas como enzima proteolítica; la tripsina es preferida especialmente.

35

La gelatina usada para llevar a cabo la invención será estéril, libre de pirógenos y no-antigénica. Dicha gelatina es la de tipo "standard" y bien conocida (por ejemplo Knox 250 o Pharmagel A) y es normalmente preparada de huesos de vaca fina o piel de cerdo y puesta en el mercado como un sólido seco. La gelatina puede ser utilizada en solución acuosa y será parcialmente hidrolizada (por ejemplo por calentamiento en ácido diluido). de este modo, puede prepararse una solución acuosa de gelatina parcialmente hidrolizada (hidroxilato de polipeptida) disolviendo 22% por peso de gelatina (por ejemplo Knox 250 A o Pharmagel A) en solución caliente de ácido hidroclicórico N 0,001 conteniendo 0,01% de Paraben de Propilo y 0,09 % de Paraben de Metilo (peso por volumen), calentando la mezcla en una autoclave durante dos a cinco horas a 100°C. o durante una a tres horas a 120°C, filtrando y diluyendo después hasta la concentración deseada con agua destilada conteniendo los Parabenos de las concentraciones antes indicadas. El pH se ajusta a 3,2 a 4,8, preferentemente alrededor de 3,6, con ácido hidroclicórico adicional. Un 5% de la solución acuosa es generalmente aplicable para el uso. Sin embargo, pueden utilizarse soluciones menos concentradas. La solución de gelatina puede ser alternativamente preparada disolviendo el 10% por peso en una solución caliente de ácido hidroclicórico N 0,01 conteniendo 0,01% de Paraben de propilo y 0,09% de Paraben de Metilo

40

45

50

55

60

233222



65

peso por volumen. La solución resultante se calienta a 80 - 100°C y se mantiene a esa temperatura durante una hora; luego se filtra y el pH de lo filtrado se ajusta a un 3,2 a 4,8 con ácido hidroclicóric; después esta cantidad filtrada es diluida con agua que contiene 0,01% de Paraben de Propilo y 0,09% de Paraben de Metilo para obtener una solución del 5%.

70

En lugar del ácido hidroclicóric utilizado al preparar las soluciones de gelatina arriba indicadas, pueden usarse otros ácidos fuertes, no reactivos, apropiados, tales como el ácido fosfórico o láctico. Es importante, sin embargo, que el pH de la solución de gelatina final sea mantenido a 3,2 a 4,8, preferentemente alrededor de 3,6.

75

Los parabenes son empleados como preservadores y pueden utilizarse otros Parabenes en lugar del Paraben de Propilo y de Metilo, u otros preservadores, tales como fenol, acresol, p-chlorocresol o timersol.

80

Las composiciones inyectables pueden ser preparadas de una forma disolviendo tripsina cristalina, por ejemplo, en agua destilada, o con preferencia en una pequeña cantidad de ácido hidroclicóric N 0,01 e incorporándola luego en una solución acuosa de gelatina estéril, libre de pirógenos y no-antigénica, parcialmente hidrolizada, por ejemplo, como se ha descrito antes. La tripsina liofilizada, preparada disolviéndola en agua o en ácido hidroclicóric N 0,01 helándose y secándose por congelación, puede ser fácilmente disuelta directamente en un 5% de solución acuosa de gelatina estéril, libre de pirógenos y no-antigénica, parcialmente hidrolizada, para formar una composición apropiada para la inyección. La compo-

85

90

23



233222

95

100

sición resultante se ajusta a un pH de alrededor de 4, añadiendo más ácido o álcali y puede ser amortiguada para mantener este pH mediante la adición de ácido o álcali. El ácido hidroclicórico o el hidróxido sódico es usado normalmente para el ajuste del pH. Sin embargo, pueden utilizarse otros ácidos, tales como el fosfórico o el láctico y otros alcalíes, tales como el hidróxido potásico. La composición es mantenida a un pH ácido en la medida de 3,2 a 4,8, preferentemente 3,6. Pueden agregarse también preservadores tales como el Parasept-Propil (alrededor de 0,01 a 0,02% por peso) y el Parasept-Metil (alrededor de 0,09 a 0,18% por peso).

105

110

115

En otro aspecto del invento se puede preparar menstros de tripsina y gelatina por separado y combinar las dos inmediatamente antes de usarlas. En este aspecto la tripsina puede ser usada como tal. Sin embargo, se añade preferentemente suficiente ácido fuerte, no-reactivo, a la tripsina (por ejemplo, ácido hidroclicórico N 0,01) para formar una solución que tiene un pH de alrededor de 2-3, y luego se seca por congelación la solución resultante para obtener un producto que es fácilmente soluble para mezclar con el menstros de la gelatina. Este menstros de la gelatina se preparara del modo arriba descrito (es decir, disolviendo la gelatina parcialmente hidfolizada (hidrolizato de polipéptida) en ácido diluido, añadiendo preservadores, calentando, filtrando y diluyendo y después ajustando el pH a 3,2 a 4,8).

120

En una fase adicional del invento, se puede preparar una combinación liofilizada de tripsina y gelatina, mediante combinación con el menstros acuoso inmediatamente antes



233 242

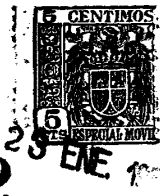
125 del uso. Esto puede hacerse secando por congelación una so-  
lución de tripsina en gelatina para obtener una mezcla fá-  
cilmente soluble en el menstruo acuoso. El menstruo acuo-  
so puede contener preservadores (por ejemplo, 0,1% de Para-  
benes) o ácido (por ejemplo, ácido hidroclicóric); o puede  
ser salina isotónica. En todo caso, es importante que la  
composición final formada por la combinación del componen-  
te tripsina gelatina con el menstruo acuoso tenga un pH de  
130 3,2 a 4,8, preferentemente 3,6, antes de usarla.

La administración por inyección se efectúa preferente-  
mente por vía intramuscular, utilizando 2-1/2 - 5 mg. de  
tripsina u otra enzima proteolítica (teniendo 1/2 ó 1 ml.  
de composición una concentración de 5 mg. ml. de tripsina),  
135 de una a cuatro, o más veces diariamente, como el caso re-  
quiera.

A continuación siguen ejemplos más específicos, ilustra-  
tivos, pero no limitativos, de la invención. A menos que se  
indique lo contrario, todas las partes son por peso.

140 Ejemplo I

Alrededor de 5mg./ml. de tripsina cristalina se agregan,  
mediante agitación, a un 5% de solución acuosa de gelatina  
parcialmente hidrolizada, libre de pirógenos y no-antigéni-  
ca (Knox 250 A), preparada calentando la gelatina en ácido  
145 hidroclicóric N 0,01 a 100°C. durante tres horas. A la mez-  
cla resultante se agrega alrededor de 0,09% de Parasep-Me-  
til y 0,01% de Parasept-Propil, y después de que se logra  
la uniformidad mediante agitación, se ajusta el pH a 3,6  
añadiendo la cantidad requerida de ácido hidroclicóric o hi-  
dróxido sódico. Desde luego, puede obtenerse un pH de 3,2,  
150 3,5 ó 4,5, variando la cantidad de ácido o álcali, y puede



233222

alterarse la concentración de tripsina variando la cantidad de enzima agregada a la solución de gelatina. El producto, ajustado a un pH de 3,2 a 4,8, puede ser utilizado como tal para inyección por el procedimiento conocido.

155

Ejemplo II

Primer frasco - Menstruo de gelatina

Gelatina Knox 250 A	3000 gramos
Paraben-Propil	6,0 -
Paraben-Metil	54,0 -
Acido hidroclicrico concentrado (36,5 a 38%)	90 ml.
Agua destilada, q.s.	60 litros

160

Se traen 55 litros de agua para hervir y se agregan Paraben-Propil y Paraben-Metil. Se agrega después el ácido hidroclicrico a la solución acuosa y se efectúa la mezcla para alcanzar la uniformidad. Después se añade la gelatina y la mezcla resultante se calienta a 80 - 100°C. y se mantiene esta temperatura durante una hora.

165

El pH se ajusta ahora a 3,5 con ácido hidroclicrico adicional, y la solución toma volumen con agua destilada.

170

Se agregan 30 gramos de Hi-Flo estéril, lavado con ayuda de filtro, y la solución se filtra a través de papel Whatman n° 52.

175

Se introduce después en frascos-ampollas en porciones de 5,8 ml. y se esterilizan durante media hora a 100°C.

Segundo frasco - Tripsina Liofilizada

Tripsina Cristalina	125 gramos
Acido hidroclicrico N 0,01, q.s.	5000 ml.

180

La tripsina se disuelve en el ácido hidroclicrico y se filtra a través de papel Whatman del n° 52. Después se filtra a través de un filtro Selas 02 a un envase esterilizado. En condiciones asépticas se llena cada frasco con 1,0 ml. y sigue la liofilización.



233222

185

5 ml. de menstruo de gelatina se mezclan con 25 mg. de tripsina liofilizada para uso en inyección.

Ejemplo III

Primer frasco - Menstruo acuoso

190

Paraben-Propil	6,0 gm.
Paraben-Metil	54,0 gm.
Agua destilada, q.s.	60 litros

195

Se disuelven los Parabenes en agua destinada y la solución resultante es filtrada a través de un medio de incorporación e introducida en frascos-ampollas, conteniendo cada uno de ellos 5,8 ml. de solución y se los esteriliza durante 20 minutos a 120°C.

Segundo Frasco -Tripsina-Gelatinam Liofilizado-

200

Se prepara una solución de gelatina, tal como se describe en el ejemplo II, excepto por lo que respecta a la concentración de gelatina que se aumenta al 25%.

Se prepara una solución de tripsina, tal como se describe en el ejemplo II y se filtra a través de un filtro bacterial (Selas 02) en un recipiente esterilizado.

205

En condiciones estériles se agregan cinco litros de la solución de gelatina estéril descrita, a la solución de tripsina, y el pH se ajusta a 3,6.

2,0 ml. de la solución resultante que contiene 25 mg. de tripsina y 0,5 de gelatina se introducen en frascos-ampollas y se liofilizan los contenidos del modo corriente.

210

5 ml. del menstruo acuoso se mezclan con gelatina-tripsina liofilizada para uso en inyección. El contenido de un frasco entero de gelatina-tripsina liofilizada se utiliza para este fin.

Las composiciones proporcionadas mediante la invención



233222

215

pueden utilizarse especialmente para el alivio de las manifestaciones inflamatorias y edematosas, preferentemente tromboflebitis y flebotrombosis. Pueden ser también utilizadas en el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias.

220

De este modo, se ha comprobado que son útiles en casos de iritis y otras condiciones inflamatorias de los ojos y en diabéticas y otras úlceras de las piernas. Cuando se usan intramuscularmente, es preferida la inyección profunda.

225

La jeringa usada en la inyección es la que preferentemente utiliza una aguja del #20; la inyección se efectúa normalmente despacio, en el músculo glúteo. Pueden utilizarse también las composiciones del mismo modo para atenuar las secreciones mucosas en la región respiratoria superior, como las halladas en el asma bronquial.

230

Se han obtenido datos de la prueba utilizando una solución de 3 mg./ml. de tripsina cristalina en 5% de gelatina. La solución, con un pH de 4,1, fué comprobada por el procedimiento conocido de digestión de hemoglobina (esencialmente el de Northrop, Kunitz and Herriar, "Crystalline Enzymes", Columbia University Press, 1948, página 107);

235

y los resultados de la prueba mostraron que, después de dos semanas a temperatura ambiente, no se originó ningún cambio en la actividad triptica. También se hicieron pruebas (utilizando la solución arriba indicada) mediante un método, esencialmente el de Fabinyi-Szebehelz, Brit. J.

240

Pharmacol, 8, página 30, 1953, y los datos obtenidos mostraron que la actividad de la tripsina en gelatina fué comparable a la de tripsina en aceite (Parenezima).

23



233222

NOTA

245

En resumen: La Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

250

1).- Un procedimiento de preparación de una composición de enzima proteolítica estable, caracterizado porque se incorpora, parcialmente hidrolizada, gelatina estéril, libre de pirógenos y no-antigénica y una enzima proteolítica en un medio acuoso, con ajustado del pH, si resulta necesario, de manera que la solución acuosa tenga un pH dentro de la medida de 3,2 a 4,8.

255

2).- Un procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la enzima per se o una solución acuosa de la enzima, se combina con una solución acuosa de la gelatina.

260

3).- Un procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la enzima en forma liofilizada se agrega a una solución acuosa de gelatina.

265

4).- Un procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que una mezcla de la enzima y la gelatina en forma liofilizada se agrega a un medio acuoso.

5).- Un procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que la enzima proteolítica es tripsina.

270

6).- Se reivindica, por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA COMPOSICION DE ENZIMA PROTEOLITICA ESTABLE".

Todo conforme queda descrito en la presente memoria, que consta de diez páginas.

Madrid, 23 enero 1957

ALFONSO UNGRIA