

253749



P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de:

DOM PEDRO PUIG MUSET, de nacionalidad española, residente en Hòllins de Rey (Barcelona), por:

"PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LA ESTABILIZACION DE ENZIMAS INESTABLES, ESPECIALMENTE DE LA CATALASA".

- - - - -

Memoria descriptiva

Esta invención hace referencia a un nuevo procedimiento para obtener la estabilización de enzimas inestables, especialmente de la catalasa, que pierden rápidamente su potencia cuando se almacenan.

5 Es bien sabido que preparados puros de varias enzimas como la catalasa (hepato-catalasa y hemato-catalasa) y otras, no se conservan bien cuando se almacenan a temperatura ambiente, en recipiente cerrado, ni siquiera en estado sólido.

10 Las disoluciones de estas enzimas, se estropean en el transcurso de varias horas de ser mantenidas a la temperatura

253749



ambiental o a la de la nevera, pero también si se almacenan en estado sólido y cristalino, en condiciones de perfecta pureza, se observa que pierden su potencia al cabo de varios días de almacenamiento.

15. También es conocido el hecho de que si una disolución de catalasa pura cristalizada o de aldolasa o bien de 17-hidroxigoticoide dehidrogenasa se someten a la liofilización en las más onduladas condiciones, pierde un elevado porcentaje (hasta el 50%) de su actividad enzimática original.

20. La extrema sensibilidad de los mencionados enzimas, hace actualmente imposible por otra parte, la comercialización de los mismos para su utilización como agentes terapéuticos, puesto que es inevitable que transcurran varios meses entre el momento del llenado de las ampollas o de los viales en los laboratorios farmacéuticos y el de su aplicación medicinal por parte del cliente o del médico.

25. Ahora bien, hemos descubierto recientemente, que si una disolución de catalasa pura cristalizada, o de otro enzima sensible, previamente mezclada con una disolución concentrada de un disacárido como la sucrosa, lactosa o maltosa, se somete a la liofilización, durante esta operación no se observa pérdida de actividad enzimática alguna, y el producto liofilizado obtenido se conserva bien, indefinidamente, sin que haya pérdida aparente de su potencia original. Unas muestras de hepato-catalasa al estado sólido obtenidas por liofilización de una disolución conjunta del enzima cristalizado y de sacarosa, nos han permitido comprobar que después de conservadas en viales cerrados, a la temperatura ambiente, por un período de tiempo de 12 meses, no han experimentado pérdida sensible de su actividad investigada ésta por los métodos espectrofotométricos y otros



corrientemente empleados para establecer la potencia de la ca-
tálisis. Mas, los paralelos realizados con otros materiales han pro-
ducido análogos resultados de conservación.

45 De la conocida sensibilidad de la catalasa al contacto
con el vidrio, los viales empleados para la liofilización de
las disoluciones y para la conservación del producto, han de
estar previamente siliconados interiormente.

50 El nuevo proceso de liofilización de una disolución enzi-
mática que contiene disuelta conjuntamente una gran proporción
de un disacárido, permite la obtención de un preparado enzimá-
tico en el que las moléculas de la proteína se hallan íntima-
mente asociadas, envueltas y protegidas del exterior por molécu-
las del disacárido, lo que explica el efecto conseguido de su
perfecta estabilidad y conservación. Por esto proponemos denomi-
55 nar el nuevo procedimiento objeto de la presente invención "Pro-
ceso de fijado molecular por liofilización".

El siguiente ejemplo específico ilustra nuestra invención:

Ejemplo

60 A una disolución de 10 mg. de hepato-catalasa cristalizada
en 100 ml. de una disolución de cloruro sódico (0,9%) se le adi-
cionan 100 ml. de una disolución de sucrosa al 50% peso-volumen.
La mezcla se efectúa en la refrigeradora, utilizando ambas di-
soluciones previamente enfriadas, y la temperatura debe mante-
nerse por debajo de + 5° C. El líquido así obtenido se esterili-
65 za convenientemente por síndolo a través de una membrana esteri-
lizante, y después se distribuye asépticamente entre varios via-
les (previamente esterilizados y siliconados) utilizando una
máquina dosificadora alocuada, que permite introducir en cada
recipiente el volumen deseado de disolución, de acuerdo con la
70 cantidad exigida de hepatocatalasa. Entonces se procede a la
congelación rápida del contenido de los viales, manteniéndolos

253749



un corto tiempo a temperatura inferior a 50° C y finalmente se
procede a la liofilización del líquido utilizando las técnicas
corrientes y conocidas para llevar a cabo esta operación en con-
75 diciones asépticas. Finalmente, los viales se tapan hermética-
mente y se encapsulan, y después de convenientemente etiqueta-
dos quedan listos para su expedición y para su empleo terapéu-
tico. Para disolver el sólido liofilizado y poder utilizarlo
para su administración por vía inyectable, se emplea como solven-
80 te una disolución 0,05 N de tampon fosfatos de pH 7.0. Este tam-
pon es el indicado por conocerse que no inactiva la catalasa.

El producto obtenido por este nuevo proceso de "grajeado
molecular por liofilización" esta constituido por una íntima
mezcla molecular de hepatocatalasa y de sucrosa, en las que las
85 moléculas del enzima se hallan envueltas y protegidas del am-
biente, por un gran número de moléculas del disacárido emplea-
do. En substitución de la sucrosa, puede utilizarse indistinta-
mente la lactosa o la maltosa, y la técnica general descrita
es aplicable para la estabilización de otros enzimas sensibles
90 tales como aldolasa o 17-hidroxi esteroideo dehidrogenasa.

REIVINDICACIONES

1). Procedimiento para obtener la estabilización de enzimas
inestables, especialmente de la catalasa, aldolasa, 17 hidroxí-
esteroide dehidrogenasa, o un "proceso de grajeado molecular
95 por liofilización", caracterizado por someter a la liofiliza-
ción una disolución enzimática que contiene conjuntamente una
elevada proporción de un disacárido disuelto, (sucrosa, lactosa
o maltosa), con lo que se consigue que las moléculas del enzima
en el sólido liofilizado, se hallen íntimamente mezcladas con
100 las del disacárido y envueltas por un gran número de moléculas

253749



del mismo, que aislen y protejan al producto del ambiente exterior, a la manera que un envasado protege el núcleo de una tableta, con lo que se consigue que el preparado enzimático obtenido conserve su potencia.

105

2). PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LA ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS Y TABLETAS, ESPECIALMENTE DE LA CARAMELA.

Esta Memoria consta de cinco hojas foliadas y mecanografiadas por un solo lado de sus caras.

Madrid, a 16 de Diciembre de 1959