

256719

22 MAR



256719

REVISTA DE INVENCIÓN

Le A 5321

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de soluciones puras"
"del inactivador calicreina".

=====

Solicitante:

FABRIK FÜR KALICREIN-ABWEISUNG Aktiengesellschaft, entidad
alemana, domiciliada en LEWIS-STRASSE 11, MÜNCHEN, Alemania.

===== •

El inactivador calicreina está contenido en los más distintos órganos animales, por ejemplo en las glándulas linfáticas y parótidas del oído, en el hígado, pulmón, páncreas y en la sangre. Tiene una importancia terapéutica como inhibidor de la hormona de la circula-

256719

22 MAR 1967



ción calicreína, como inhibidor de fermentos proteolíticos y como medio para la introducción de grandes dosis de calicreína en forma inactiva.

- Ya se conocen algunos procedimientos para la obtención del inactivador calicreína. Así por ejemplo, describe la patente alemana 954.284 un procedimiento para la obtención del inactivador calicreína de órganos animales, por ejemplo de las glándulas linfáticas o parótidas del oído de rumiantes, que se caracteriza porque de los extractos acuosos o ácidos acéticos de glándulas desengrasadas y secadas se precipitan los cuerpos de albúmina con ácido tricloroacético, las soluciones del inactivador se ponen a una reacción ligeramente alcalina y se mezclan con un volumen igual de alcohol, con lo que se precipitan las materias acompañantes ineficaces, el filtrado se ajusta con ácido acético a un valor pH de 6, se concentra por evaporación en vacío y el activador se precipita con diez veces su cantidad de alcohol.

- Además, la patente alemana 950.959 describe un procedimiento para la obtención del inactivador calicreína de glándulas linfáticas y parótidas del oído, páncreas o sangre, que se caracteriza porque los órganos frescos se desengrasan dos veces con 5 veces su volumen de acetona, después se extraen bajo calor con alcohol ácido diluido, los extractos se concentran por evaporación en vacío y se agitan con éter, de la fase acuosa se precipita el inactivador con alcohol, acetona u otro disolvente orgánico miscible con agua, la precipitación se disuelve en ácido acético diluido, las materias acompañantes ineficaces se retiran mediante el ajuste de una reacción ligeramente



alcalino y el inactivador se vuelve a precipitar con alcohol, acetona u otro disolvente orgánico miscible con agua.

5. Por la patente alemana 956.097 se conoce que el inactivador calicreina se puede obtener en forma análoga del hígado, bazo o colostrum.

10. Otros procedimientos para la obtención del inactivador calicreina del hígado están descritos en las patentes alemanas 1.014.288 y 1.011.576. Según la primera, el hígado de la res se homogeniza, se extrae con ácido tricloroacético acuoso diluido, éste se retira mediante extracción continua con éter, el inactivador se precipita con solución de sulfato amónico saturada, la precipitación se disuelve en agua y se precipita con ácido picrínico. 15. El picrato se descompone con ácido diluido y esta solución se cromatografía dejándola fluir sucesivamente por encima de un intercambiador de iones ligeramente básico y después sobre uno ligeramente ácido, en el cual se liga el inactivador y después se eluye de nuevo con 20. ácido.

Según la segunda patente en el proceso anteriormente descrito solo la precipitación con sulfato amónico y ácido picrínico se sustituye por una precipitación con acetona ácida.

25. Todos estos procedimientos son inadecuados para una obtención técnica en gran escala del inactivador; resultan demasiado complicados y caros, ya que se han de efectuar de 7 hasta 9 etapas de limpieza y muy a menudo se ha de hacer uso de métodos exclusivamente de laboratorio. 30. El largo proceso de obtención exige un gran número de horas de trabajo y, además, da lugar a infecciones

22 MAR

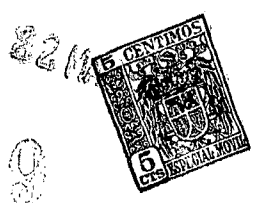


bacteriales con lo que pueden penetrar pirógenos en la solución que hacen que el producto final sea inadecuado para una aplicación terapéutica. Las continuas extracciones con éter, el evaporado de grandes volúmenes en vacío así como el desengrasado y secado de órganos son en, 5. cascada técnica, muy caros y poco racionales.

Además resulta desventajoso para la aplicación terapéutica que los preparados a pesar de la eliminación de albúmina efectuada al principio en solución diluida, 10. después de la elevada concentración aún necesaria al final, muchas veces aún se encuentren restos de albúmina que le pueden provocar al paciente reacciones alérgicas y shock anafiláctico.

Se ha descubierto ahora que se pueden evitar 15. todos los inconvenientes arriba indicados y lograr en pocas etapas, técnicamente sencillas, soluciones muy puras del inactivador calicreina, si los órganos de animales que contengan el inactivador calicreina, preferentemente paretis, hígado o pulmón, se extraen con 20. soluciones que contengan disolventes orgánicos acuosos, convenientemente miscibles con agua, preferentemente etanol, de sales o hidróxidos de metales alcalino terrosos o de sales alcalinas, el extracto se precipita con una cetona, preferentemente con acetona y en presencia 25. de una sustancia vehículo inerte finamente distribuida, la precipitación separada se extrae con agua, preferentemente después de secar, la restante albúmina se precipita cuantitativamente de la solución mediante un medio precipitador de albúmina, preferentemente con ácido sulfosalicílico, y después de separar la precipitación de la restan- 30.

22/11 1971



- te solución se retira la albúmina en exceso con ayuda de intercambiadores de iones. Se obtiene un elevado rendimiento de una solución de inactivador de gran pureza y concentración que, sin más, se puede aplicar en grandes dosis intravenosa o intramuscular ente. En detalle el procedimiento se efectúa como sigue:
5. Especial ente ricos en inactivador calicreina son, como es sabido, las glándulas linfáticas y parótidas del oído, hígado, bazo y páncreas, así como según D. Morle el pulmón de los mamíferos. Los órganos se desmenuzan en estado fresco o congelado en el cortador o máquinas de picar. El desengrasado o lavado con 10 veces la cantidad de acetona necesario en los procedimientos hasta ahora usuales no es necesario con este procedimiento.
 10. La liberación de la materia activa se efectúa mediante una simple agitación de los órganos desmenuzados con 2 - 4 veces la cantidad del medio de extracción. Se efectúa sin la adición de ácidos, ya que de esta manera se disuelven considerables cantidades de materias acompañantes que molestan el ulterior proceso de limpieza.
 15. Mediante la adición de sales o hidróxidos de los metales alcalino-terroso o sales alcalinas se logra un rendimiento muy elevado con un grado de pureza simultáneamente favorable. Aquí demuestra ser conveniente, si al medio de extracción se le agregan disolventes orgánicos miscibles con agua, preferentemente etanol. Así se obtiene por ejemplo después de 1/2 hora de extracción de parotis con una solución de etanol al 75 %, que contenga 1 % de $CaCl_2$, a 40°, un grado de pureza de 35 % de substancia orgánica por
 20. EIE con un rendimiento de unos 500.000 EIE/kg de parotis.
 - 25.
 - 30.

22 MAR 19



256719

Bajo iguales condiciones se obtiene del pulmón un grado de pureza de 7 - 9 % con un rendimiento de unos 1,2 millones KIU/kg de pulmón.

- Ocasionalmente se pueden emplear para la extracción también aquellos disolventes que por lo pronto no contengan agua, pero, sin embargo, recojan el agua necesaria para la extracción de las glándulas frescas.
- 5.

- El efecto de las distintas sales e hidróxidos no es específico: varían solo las condiciones de extracción que son óptimas al emplearse CaCl_2 . Se puede trabajar igualmente por ejemplo también con Mg Cl_2 , sulfato amónico, sal común o sales similares. Al emplearse hidróxidos, la solución no deberá mantenerse ni muy fuerte ni demasiado tiempo alcalina.
- 10.

- La extracción se puede efectuar en medios acuosos entre 0 y 90°, convenientemente entre 20 y 50°; si el medio de extracción contiene disolventes orgánicos miscibles con agua, entonces convenientemente se trabaja con temperaturas relativamente bajas para evitar una evaporación del disolvente.
- 15.
- 20.

- La duración de la extracción depende del material inicial, de la temperatura empleada y del disolvente. Por ejemplo la parotitis da con solución acuosa de CaCl_2 al 1 - 10 % a 45° ya en 15 minutos rendimientos máximos, a 20° en 50 minutos; con solución de clorocalcio al 1 % metanólica al 70 % se agita a 40° convenientemente de 1/2 hasta 1 hora.
- 25.

- Como disolventes orgánicos miscibles con agua entran en consideración además del metanol también, entre otros, el etanol, propanol, dioxano y acetona. En la
- 30.

256719



siguiente etapa se precipita la materia activa con una cetona soluble en agua, preferentemente con acetona. Pero también se pueden emplear otras cetonas, tales como cetona nutiloetílica, cetona metiloisobutílica o ciclohexanon.

5. Según la clase del medio de precipitación y la solución de extracción se necesitan para la precipitación cuantitativa de 2½ hasta 3 veces la cantidad de cetona. Si la precipitación se efectúa de órganos que contengan el material activo en forma relativamente pura, entonces no se forma una precipitación sino una fina suspensión lechosa que contiene el material activo en forma de pequeñísimas gotitas aceitosas. Estas se depositan en las paredes de la caldera y en el agitador como una película delgadísima y no se pueden obtener de esta manera en escala técnica. Por esta razón se agita en la solución, antes de la precipitación de cetona, una substancia vehículo inerte adecuada en fina distribución y entonces se vierte el medio de precipitación. En este caso las minúsculas gotitas de aceite son recogidas totalmente por el material vehículo, por ejemplo tierra de infusorios, creta y similares. Después de parar el agitador, baja rápidamente el material vehículo hacia el fondo y se puede separar fácilmente de la solución clara que queda encima. De esta manera se efectúa la precipitación del inactivador casi sin pérdida y se evita el centrifugado o filtrado de los volúmenes relativamente grandes.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

La masa vehículo cargada con el inactivador se seca convenientemente antes de su ulterior elaboración; si la precipitación se efectuó con acetona, entonces se aparece ésta sobre una chapa de secado al aire y en pocas horas se obtiene un polvo seco. Si se emplearon cetonas

30.

22 MAR 1960



256719

- con punto de ebullición más elevado, entonces el vehículo se lava con algo de éter antes de secar. De este polvo se puede disolver la materia activa con agua en pocos minutos sin pérdida alguna y separar en el filtro de vacío de la substancia vehículo. De esta manera se pueden lograr elevadas concentraciones - hasta 15.000 HIE en 1 cm³. Por esta razón se pueden elaborar los preparados - hasta los de 100 mg de glándulas y más - desde esta etapa en el laboratorio. La albúmina aún existente en la solución se retira cuantitativamente mediante precipitación con una cantidad relativamente reducida de un medio de precipitación de albúmina - preferentemente mediante una solución de ácido sulfosalicílico acuoso. Después de separar la precipitación de albúmina se encuentra el inactivador prácticamente cuantitativamente en la solución restante, mientras que al retirar la albúmina con ácido tricloroacético, acetato uranílico y ácido metafosfórico algunas veces se presentan pérdidas mayores.
- El exceso del medio de precipitación se retira mediante agitación con un intercambiador de iones adecuado. Como especialmente adecuado demostró ser el intercambiador de aniones Amberlite IRA-410, criba 20-30 mesh, cargado con sosa cáustica. Pero también se pueden emplear otros intercambiadores, por ejemplo Lewatita LNH, cargado con NH₃. La eliminación del ácido sulfosalicílico se logra especialmente de risa si la solución se trata primero durante 10 minutos con un intercambiador de cationes, por ejemplo, Amberlita MB-120, cargado con HCl. Si a la solución libre de cationes se agrega el intercambiador de aniones arriba mencionado, entonces ya después de 20-25 minutos no se
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



puede demostrar huella alguna del ácido sulfosalicílico.

Este procedimiento ofrece grandes ventajas comparado con los trabajos con columnas intercambiadoras que, debido a su reducida velocidad de paso, son muy

5. lentas y forzosamente conduce a fuerte ampliación del volumen y dilución. Además en el método de agitación se puede comprobar con facilidad el momento en que ha terminado la intercambiación. La posible separación inmediata de la solución de los intercambiadores evita las considerables pérdidas a esperar por una reacción secundaria. No se produce una ligazón del inactivador a los intercambiadores, tal y como está descrito en la patente alemana 1.014.288 y 1.011.576.

15. La solución libre de sal y albúmina se aspira de los intercambiadores, se lava ulteriormente con poca agua redestilada, se ajusta el valor pH a 5 - 6, y después de diluir según el ajuste biológico se puede cargar esterilizada en ampollas. Está libre de pirógenos, no contiene antígenos y se puede reportar hasta en
20. dosis muy elevadas aplicadas intravenosamente por el ser humano sin reacción alguna. Las preparaciones grandes en escala técnica dan rendimientos iguales que superan en 2 - 3 veces las de los procesos conocidos. También los grados de pureza logrados son muy elevados; se encuentran
25. al emplear solución isotónica de CaCl_2 con parotis en el promedio de 1,8 γ , en el pulbón en 0,9 γ .

Ejemplo 1.

30. 5 kg de parotis de res se desmenuzan en la máquina de picar y agitando se introducen en una solución de 150 g de cloruro de calcio en 2,2 l de agua y 12,8 l



de metanol. Después se coagula durante 1/2 hora a 40°C y esta temperatura se mantiene constante durante 1 hora. Se centrifuga a 1000 rpm y el líquido se separa en una prensa de filtro o se centrifuga del residuo. Este se lava con 1,5 litros de metanol al 70% y los filtrados clarificados se reúnen.

Después se le agrega a la solución, agitando fuertemente, 60 g de tierra de infusorios y se dejan fluir 40 litros de acetona. Después de 1/2 hora se para el agitador; la tierra de infusorios cargada con la materia activa baja inmediatamente al fondo, la solución que se encuentra encima es clara como el cristal y se saca por sifón de la sedimentación al fondo. El residuo se centrifuga, se lava ulteriormente con 600 cm³ de acetona y después se espesa sobre una chapa de secado. En pocas horas se obtiene un polvo seco que se agita durante 10 minutos con 260 cm³ agua redestilada. El material activo se disuelve, la tierra de infusorios se aspira y lava ulteriormente con 250 cm³ de agua redestilada.

Los filtrados reunidos se vierten agitando tanto en una solución de ácido sulfosalicílico acuoso al 20 % hasta que se haya completado la eliminación de albúmina. Para ello se necesitan 65 - 80 cm³ del medio de precipitación. La precipitación se aspira por un filtro de vacío, el material activo se encuentra en la solución.

Para retirar el agente de precipitación de la albúmina en exceso se agita en la solución 150 cm³ de intercambiador de cationes cargado con ácido clorhídrico Amberlite MB-3 con el índice de criba 20-50 mesh. Después de 15 minutos se separa la solución ácida del intercambiador y se lava con algo de agua redestilada. Después se



97 19

- aguta la solución con 400 cm³ de intercambiadores de aniones Amberlite IRA 410 del índice de criba 20 -50 mesh, que se cargó con sosa cáustica, hasta que en una prueba no se puede demostrar ninguna huella de ácido salicílico
5. (Reacción de color con cloruro de hierro). La solución separada del intercambiador se neutraliza con algo de ácido clorhídrico. Contiene 1.450.000 de unidades de inactivador de coagulancia (IIC); 1 IIC está ligado a 1,7 γ de sustancia orgánica. En lugar de metanol también se puede emplear etanol como disolvente orgánico.
- 10.

Si la liberación de la materia activa de las glándulas se efectúa con una solución acuosa de calcio clorhídrico sin adición de un disolvente orgánico, entonces se obtienen 525.000 IIC del grado de pureza 13 .

15. El calcio clorhídrico se puede sustituir por cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de estroncio, cloruro de bario, hidróxido cálcico, cloruro sódico, bicarbonato sódico, carbonato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, sulfato sódico, nitrato de calcio, acetato cálcico o nitrato sódico.
- 20.

Si en lugar de la acetona se emplea para la precipitación del material activo de la solución metanólica la acetona nitriloalcohólica, entonces se obtienen 1.050.000 IIC; 1 IIC está entonces ligada a 7,8 γ de sustancia orgánica.

25. Si por el contrario la acetona se sustituye por dioxano, entonces el rendimiento es de 920.000 IIC del grado de pureza 9,8 γ .

- Si en el procedimiento descrito al principio se efectúa la separación de la albúmina con ácido tricloroacético en lugar de ácido sulfosalicílico, entonces se logra
- 30.



un rendimiento de 970.000 IIE con un grado de pureza de 4,1 γ . Si en lugar de parotis de res se emplea hígado de res y por lo demás se procede como arriba indicado, entonces se obtiene el inactivador calcicreina en rendimientos similares.

Ejemplo 2.

5 kg de pulmón de res desmenuzado se calientan con una solución de 150 g de calcio de cloro en 13 litros de metanol, agitando bien, durante 1 hora a 40^o, el residuo de las glándulas se centrifuga después de enfriar y se lava ulteriormente con 1,5 litros de metanol. Los filtrados reunidos se clarifican a través de un filtro Seitz y en esta solución se agitan 60 g de tierra de infusorios. Se deja fluir 40 litros de acetona, se agita aún durante 1/2 hora y se separa la precipitación. El residuo se lava con algo de acetona y se le seca al aire.

El polvo se extrae dos veces cada una con 200 cm³ de agua redestilada, cada vez durante 1/4 de hora y los filtrados reunidos se precipitan cuantitativamente con 65 cm³ de una solución de ácido sulfosalicílico acuoso al 20 %. Después de separar la precipitación se agita la solución durante 10 minutos con 70 cm³ del intercambiador de iones amberlita IR-120, se aspira y el filtrado se agita durante 1 hora con 450 cm³ del intercambiador Amberlita IRA-410. La solución separada del intercambiador se neutraliza con poco ácido clorhídrico. Se obtienen 4.250.000 IIE del grado de pureza 0,7 γ .

Si la extracción de la materia activa de las glándulas no se efectúa en una solución metanólica sino en una solución clorocálcica acuosa al 1%, entonces se



23 MAR 1959

necesitan para la precipitación de la materia activa
110 litros de acetona.

La ulterior elaboración se efectúa como descrito.
El rendimiento es de 1.050.000 UIU con un grado de pureza
5. de 7,2 γ.

N O T A

Describe suficientemente la naturaleza del
invento así como la manera de realizarlo en la práctica,
debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente
10. indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle
en cuanto no alteren su principio fundamental. También se
hace constar que el invento corresponde a una solicitud
de patente presentada en Alemania con fecha 28 de Marzo
de 1959 nº F 28061 IVa/30h accogiéndose por lo tanto a los
15. beneficios que conceden los Convenios Internacionales en
vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido
invento y por lo que se solicita Patente de Invención
por 20 años en España: "Procedimiento para la obtención
de soluciones puras del inactivador calicreina"; caracte-
20. rizándose por lo siguiente:

1º.- Procedimiento para la obtención de soluciones
puras del inactivador calicreina, caracterizado, porque
órganos de animales desmenuzados que contienen inactivador
calicreina, preferentemente parotis, hígado o pulmón, se
25. extraen con soluciones acuosas de sales o hidróxidos de
los metales álcali terrosos o de sales alcalinas y que
contengan disolventes orgánicos convenientemente solubles
en agua, preferentemente metanol, el extracto se precipita
con una cetona, preferentemente con acetona y en presencia
30. de una sustancia vehículo inerte finamente distribuida, la

256719

22 MAR 1960



precipitación separada, preferentemente después de secar, se extrae con agua, la restante albúmina se precipita cuantitativamente de la solución con un agente precipitador de albúmina, preferentemente ácido sulfosalicílico y después de separar la precipitación se retira de la solución restante el medio de precipitación de la albúmina en exceso mediante la ayuda de intercambiadores de iones.

2º.- Procedimiento para la obtención de soluciones puras del inactivador calcireina; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22 MAR. 1960

FABRIKABRIKEN BAYER Aktiengesellschaft.

J. GÓMEZ LERO Y MUÑOZ