

260932

260932

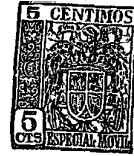
MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de registro de una Patente de Invención, por veinte años, en España, por "Método para la purificación de streptokinasa", a favor de "MERCK & CO., INC.", entidad de nacionalidad norteamericana, domiciliada en Rahway, New Jersey (U.S.A.).

- - - -

5 Esta invención concierne con la preparación de streptococo hemolítico. Desde hace tiempo se ha establecido que juega un papel en la disolución de coágulos de sangre y particularmente de exudados que son ricos en componentes fi-  
brin. Dependiendo de la naturaleza y tamaño de estos coágulos, el streptokinasa o streptokinasa en presencia de plaminógeno humano efectúa la disolución de tales coágulos. Hasta ahora, el uso de streptokinasa (y plasma preparada de plasminógeno y streptokinasa) se ha limitado debido al hecho de que el  
10 streptokinasa ha sido contaminado con residuos de proteína streptocócica que ha dado lugar a reacciones tóxicas en el hombre. Estas reacciones se manifiestan por sí mismas por el aumento en la temperatura del cuerpo, caída de la presión sanguínea, sacudimiento, resfrío, anoxia, cianosis y simila-  
15 res.

Una característica de la presente invención es que ahora es posible eliminar las proteínas contaminantes de la preparación streptokinasa y obtener un streptokinasa altamen-  
te purificado. Nuestra invención se refiere principalmente a  
20 métodos que implican esta purificación. La asequibilidad con



260932

secuente del streptokinasa altamente purificado hace posible  
tratar los pacientes indiscriminadamente con streptokinasa o  
con streptokinasa plasminógeno activado. Este tratamiento ha  
resultado ser de importancia única en el tratamiento de una  
5 variedad de enfermedades tales como tromboflebitis, flebo-  
trombosis, embolismo pulmonar, trombosis coronaria, trombo-  
sis cerebral y similares.

El streptokinasa crudo que es purificado de acuer-  
do con nuestra invención puede obtenerse por procedimientos  
10 conocidos. En general, esto se logra usando streptococos he-  
molíticos como inoculación en un medio de desarrollo y dejan-  
do que el desarrollo bactericida continúe por espacio de 8 a  
10 horas. Al terminar este tiempo, la fermentación es deteni-  
da pasando el caldo a través de espirales de enfriamiento y  
15 las celdillas bactericidas son removidas por centrifugación o  
por filtración. El streptokinasa puede ser aislado del caldo  
por cualquier método conocido. Generalmente, el material ais-  
lado de esta manera es de 15 a 60% puro si se juzga por méto-  
dos físicos de homogeneidad. La presente invención concierne  
20 con la purificación final de este producto parcialmente puri-  
ficado. Esta purificación es lograda por cromatografía de co-  
lumna u hornada en resinas celulósicas de intercambio de io-  
nes de la clase descrita por Peterson y Sober (JACS 78:751,  
1956). En nuestra invención, empleamos un gradiente fosfato  
25 calmante para la elución del streptokinasa. Generalmente ha-  
blando el streptokinasa en un fosfato calmante de baja poten-  
cia es absorbido en la resina y después es eluido aumentando  
la potencia iónica del calmante. Muchas de las impurezas son  
absorbidas en la potencia iónica baja y son firmemente limi-  
30 tados a la resina de tal manera que la solución eluada de

260932



de streptokinaso resultante quede libre de estas substancias. Otros contaminantes no son absorbidos en ningún grado y son encontrados en el efluente.

5 Seleccionando correstamente las concentraciones de fosfato calmante y la fracción apropiada, es posible obtener en excelente rendimiento y de manera simple, un streptokinaso altamente purificado que tiene eficacia altamente terapéutica y está libre de contaminantes que producen reacciones laterales. Cualquier fosfato calmante comunmente usado  
10 puede emplearse, pero es preferible usar fosfato de sodio o potasio. Para hacer que el streptokinaso sea absorbido en la resina celulósica deberá ser en un fosfato calmante teniendo una concentración molar entre 0.005 y 0.015 preferiblemente alrededor de 0.010. Para remover las impurezas de la  
15 resina, un fosfato calmante deberá ser usado, el cual está dentro de la concentración molar de 0.02 a 0.06. Para eluar el streptokinaso deberá ser usado un fosfato calmante con una concentración molar que esté dentro del promedio de 0.06 a 0.15. Se encontrará que las fracciones con una concentración molar de 0.06 a 0.08 tienen las cantidades más grandes  
20 de streptokinaso.

Un procedimiento más conveniente para llevar a cabo el tratamiento anterior de la resina con calmantes fosfato de potencia aumentada, es hacer fluir a través de la columna un calmante fosfato que tenga una concentración molar  
25 inicial de 0.01, al cual es gradualmente añadido y mezclado un calmante fosfato con una concentración molar de 0.15 o más alta. De este modo la concentración molar del calmante eluante es continuamente aumentada. La porción que pasa a  
30 través de la columna hasta una concentración molar de 0.06

260932



es deshechada y la porción con una concentración molar sobre 0.06 y hasta 0.15 es recolectada. En lugar de usar tal concentración molar continuamente aumentando, es posible lavar sucesivamente la resina con calmantes se parados de potencia molar aumentada. Por ejemplo, un primer lavado puede ser con una solución 0.02 M, después con una 0.04 M, y después con un calmante 0.06 M., todos los cuales serán descartados. Las siguientes concentraciones altamente molares, 0.07 M., 0.09, 0.15 serán recolectadas ya que contienen las cantidades más altas de streptokinaso.

Algún streptokinaso será encontrado en el primer calmante eluante de 0.06 M., y consecuentemente un segundo lavado en la misma concentración molar puede ser llevado a cabo y recolectado, ya que tendrá una cantidad apreciable de streptokinaso en la misma. Es posible remover las impurezas con un simple calmante de 0.06 M. en concentración y recolectar el streptokinaso con una simple concentración calmante de, digamos 0.08 M., aunque el rendimiento de streptokinaso será relativamente menor.

En los siguientes ejemplos la celulosa DEAE es empleada pero la invención puede ser practicada con otras resinas celulósicas equivalentes, tales como celulosa TEAE, EC TEOLA, etc., descritas en el artículo periodístico anterior. Una amplia variedad de calmantes fosfato pueden ser usados, ya que son bien conocidos en el arte y pueden ser seleccionados de tierra álkali y alkalina, mono, di o tri fosfato.

La invención será aclarada por los siguientes ejemplos:

Ejemplo I.

Este ejemplo ilustra la purificación de streptoki-



260932

naso crudo por cromatografía en resina celulósica DEAE preparada de acuerdo con el artículo periodístico citado.

Es preferible acondicionar la resina antes de usarla, como sigue. Cuatrocientos gramos de DEAE son suspendidos en 8 litros de H<sub>2</sub>O y el pH es ajustado a 2 con N HCl y NaCl es entonces añadido para llevar la concentración a 5%. La mezcla es filtrada en estopella y lavada con 8 litros de solución NaCl al 5%. El material es suspendido en agua y el pH ajustado a 10.5 con N NaOH y la concentración NaCl llevada hasta el 5%, filtrada y lavada con 8 litros de NaCl al 5%. La DEAE es otra vez suspendida y el pH ajustado a 3 con N HCl. De nuevo la concentración es llevada al 5% y la resina lavada con 8 litros de NaCl al 5%. Siguiendo esto la DEAE es lavada con 20 litros de agua libre de pirógeno y filtrada.

La DEAE es suspendida en el calmante fosfato 0.01M y agitada y se deja asentar varias veces para remover las partículas. Es esencial que las partículas sean removidas con el objeto de preparar las columnas con un promedio fluido conveniente. La columna descrita anteriormente tiene un fluido de aproximadamente 500 ml./hora. Es deseable agitar la columna inmediatamente antes de usarla con el objeto de prevenir la separación del sólido de la superficie de vidrio.

Una columna de 30 cm. de largo con un diámetro interno de 52 mm. es cargada con DEAE suspendida en 0.01 de fosfato calmante. Suficiente DEAE es añadida para que después de asentarse se forme una columna de 6-7 cm.

La solución cruda de streptokinasa es indicada contra un fosfato calmante con la siguiente composición (.005-.015M, preferiblemente .01M):

30 Fosfato de Sodio Monobásico, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O -  
27.6 gr./litro

Sol. A



260932

Fosfato de Sodio Dibásico,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 28.4  
gr./litro

Sol.B

16 ml. de A) }  
84 ml. de B) } diluidos en 200 ml. de agua destilada para  
obtener un fosfato calmante de 0.1M, pH 7.5.

Esto se diluye entonces a fosfato 0.01M.

5 Después de que se ha establecido el equilibrio, el material streptokinasa está listo para su purificación. El establecimiento del equilibrio puede juzgarse midiendo la resistencia eléctrica de la solución.

10 El streptokinasa que va a ser absorbido en la resina puede ser obtenido comercialmente. El streptokinasa, en una concentración de  $10^6$  unidades/ml. o un total de  $100 \times 10^6$  unidades disuelto en 100 ml. de agua es indicado en 16-18 horas a  $3^\circ\text{C}$  contra dos litros de fosfato calmante 0.01M, pH 7.5. Con la molaridad del efluente de .06 y .07 la porción mayor de streptokinasa de alta pureza es eluida y aparece en el efluente. Las fracciones son ensayadas para contenido streptokinasa y para proteína y la pureza de las fracciones individuales son determinadas calculando la actividad específica, las unidades de streptokinasa/gamma del nitrógeno. Las fracciones ricas en streptokinasa pueden ser liofilizadas o pueden ser empleadas para la conversión de plasminógeno en plasmina.

#### Ejemplo II

25 Una columna DEAE es preparada como en el Ejemplo I y la resina equilibrada con fosfato calmante 0.08-0.12M, preferiblemente .1M. El streptokinasa crudo es dializado contra el fosfato calmante 0.08-0.12M preferiblemente 0.1M. Después de que el equilibrio ha sido establecido, el streptokinasa es introducido en la columna. La mayoría de las impurezas son retenidas en la columna mientras que la solución streptokinasa aparece en el efluente. La columna es lavada con fosfato

30

260932



calmante 0.08-0.12M, preferiblemente .1M. La columna es otra vez lavada con este calmante y la porción mayor del streptokinasa es recuperada en el efluente. Puede entonces usarse como se describe en el Ejemplo I.

5

Ejemplo III.

Preparación de columna.-Una lechada fué preparada de 1.5 gramos de DEAE en 30 ml. de .005 M de fosfato calmante de potasio a un pH de 7.0. La lechada fué vaciada en una columna cromatográfica (30 cm. de alto, 1 cm. de diámetro interno) equipada con un disco sellado y un sifón capilar.  
10 La resina fué dejada asentarse por gravedad y después empaqueta a ca 15 cm. de alto por la aplicación de presión de aire (el aire filtrado ligeramente arriba de la presión atmosférica). Una capa delgada de algodón fué colocada sobre la resina  
15 en la columna para protegerla de disturbios mecánicos. El empaque de la columna aligera la salida del fluido a través de la columna a 10-20 ml/hora.

Colocación de muestra en la columna.-Streptokinasa crudo, aproximadamente 250 mg. de proteína fué disuelto en  
20 alrededor de 15 ml. de agua y ésto fué indicado en frío (2-5°C) contra el fosfato calmante .005; después añadido a la columna. La solución streptokinasa crudo fué dejada percolarse (bajo la misma presión ligera usada en el empaque) a través de la columna antes de la adición del calmante y aumentando la potencia iónica.  
25

Elución desde la columna.-Una concentración continuamente en aumento de fosfato calmante de potasio pH 7.0 fué añadida a la columna. El gradiente de la concentración fué obtenido por el fluido de fosfato de potasio 0.3 M (pH 7.0) en  
30 un depósito de 250 ml. de calmante .005 en donde fué mezclada

260932



5 por agitación magnética. El líquido del depósito de mezclado  
salió a través de la columna - la velocidad de salida a tra-  
vés de la columna gobernando la velocidad de salida del depó-  
sito de 0.3 M al depósito de mezclado de 250 ml. El calmante  
hidrostático de fuerza principal a través de la columna po-  
drá ser variada por la elevación o disminución del depósito  
de calmante.

10 Cada 10 ml. de eluato subsiguientes fueron recolec-  
tados en un tubo separado. El ensayo del contenido streptoki-  
naso de los tubos recolectores indicó que bajo estas condicio-  
nes el volumen del streptokinasa puro era en el aluato de 100  
a 150 ml. en donde la concentración fosfato varía de .07 a 0.12  
M. A concentración más baja, las impurezas fosfato en el strep-  
tokinasa crudo fueron eluidas.

15 Ejemplo IV.

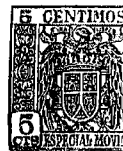
El proceso del Ejemplo IV fué llevado a cabo usando  
calmante de fosfato de sodio en lugar de fosfato de potasio.  
El volumen del streptokinasa fino se encontró ser en la pro-  
porción de 100 a 150 ml. de eluato, como en el Ejemplo III.

20 N O T A

Descrito el procedimiento que se presenta como obje-  
to de la patente solicitada, se declara que lo que constituye  
la esencialidad de esta patente, que se acoge a los derechos  
de prioridad de la patente de invención norteamericana número  
25 843.062, de fecha 29 de septiembre de 1.959, es lo que se con-  
creta en las siguientes reivindicaciones:

30 1ª.-Método para la purificación de streptokinasa,  
caracterizado por poner en contacto con celulosa DEAE una so-  
lución de streptokinasa en un fosfato calmante de concentra-  
ción molar de 0.005 a 0.015, lavando la celulosa con un fosfa

260932



to calmante de concentración molar entre 0.02 y 0.06 para eliminar las impurezas, y separando el streptokinasa de la celulosa con un fosfato calmante de concentración molar entre 0.06 y 0.15.

5           2ª.-Método para la purificación de streptokinasa, según la reivindicación anterior, caracterizado, además, por poner en contacto con celulosa DEAE una solución de streptokinasa en un fosfato calmante de concentración molar de 0.01, lavando la celulosa con un fosfato calmante de concentración molar de aproximadamente 0.06 para eliminar las impurezas y separando el streptokinasa de la celulosa con un fosfato calmante de concentración molar de alrededor de 0.08.

15           3ª.-Método para la purificación de streptokinasa, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por poner en contacto con celulosa DEAE una solución de streptokinasa en un fosfato calmante de concentración molar de 0.005 a 0.015, fluyendo a través de la celulosa un fosfato calmante cuya concentración molar progresivamente aumenta de 0.02 a 0.15 y recogiendo la porción entre una concentración molar de 0.05 y 0.15.

25           4ª.-Método para la purificación de streptokinasa, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado, además, por poner en contacto celulosa DEAE con streptokinasa en un fosfato calmante de concentración molar entre 0.005 y 0.15 eliminando las impurezas con fosfatos calmantes sucesivos que aumentan en concentración molar dentro del promedio de 0.02 a 0.06, y removiendo el streptokinasa con fosfatos calmantes sucesivos que aumentan en concentración molar dentro del promedio de 0.06 a 0.15.

30           5ª.-Método para la purificación de streptokinasa.

260932



Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria que consta de diez hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 10 de septiembre de 1.960.

El Agente:

P.P.

*Sanjurjo*