

282234

P.- 23.615

AA 1701 Spa/ih

12 FEB. 1963

Rehecha I



282234

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AKTIEBOLAGET ASTRA, APOTEKARNES KEMISKA
FABRIKER, entidad sueca, establecida en Södertälje, Sue-
cia, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO Y SEPARACION SELEC-
TIVOS DE ENZIMAS PROTEOLITICOS"

La presente invención se refiere a la prepara-
ción, extracción y separación de enzimas proteolíticos y,
también, a los enzimas así obtenidos.

5 Esta invención cubre también la fabricación de
preparaciones que contienen estos enzimas, y su empleo en
medicina para el tratamiento de heridas infectadas y diso-
lución de coágulos y oclusiones formados por componentes
de la sangre en las venas y arterias.

10 Se ha sabido durante muchos años que una gran ma-
yoría de mohos produce cantidades apreciables de enzimas

282234



5 proteolíticos. Se ha prestado mucha atención a este campo durante los últimos diez años, habiendo sido presentados muchos resultados instructivos, pero salvo pocas excepciones, estos enzimas no han sido purificados ni estudiados extensamente.

10 La proteasa de mocho rara vez es un solo enzima, sino que consiste en un sistema de enzimas proteolíticos. Han causado así mucha confusión simples expresiones, tales como proteasa del *Aspergillus oryzae* y proteasa del *Rhizopus*, y se ha necesitado alguna clasificación razonable de las proteasas de mohos. Nuestro conocimiento de la mezcla complicada de los enzimas proteolíticos que segregan diferentes mohos, es todavía muy limitado y, por lo tanto, las proteasas se han clasificado en grupos de acuerdo con el análisis de las curvas de actividad y pH aparente de diversos cultivos de mohos, con respecto a la digestión de la caseína.

15 Según el substrato y el organismo utilizado, se ha registrado un amplio margen de pH óptimos para las proteasas de mohos. La mayor parte de los investigadores han aceptado la evidencia para tres tipos de enzimas que hidrolizan las proteínas y que tienen una actividad óptima a pH ácidos, neutros y alcalinos, respectivamente. Una proteasa ácida es un componente principal de varios *Aspergilli* negros, tales como *Asp. niger*, *Asp. awamori*, y *Asp. saitoi*. Se dice que el *Aspergillus oryzae* desarrollado en un medio rico en hidratos de carbono, que conduce a un pH rebajado, produce principalmente este tipo de enzima, pero solamente poca cantidad del mismo en un medio rico en proteínas. Una proteasa neutra se ha separado de la diasta

20

25

30

282234

12F



sa-Taka, una preparación enzimática comercial procedente del *Asp. oryzae*, habiendo sido aislado del *Asp. sojae* un enzima similar. El *Rhizopus* y el *Penicillium* han sido considerados como productores de una proteasa ácida en abundancia, juntamente con otros tipos de proteasas. Se dice que una proteasa alcalina es la proteasa principal del cultivo del *Asp. oryzae*, produciendo también este tipo de enzima muchos otros *Aspergilli* y algunos *Penicillia*.

No es suficiente una clasificación y caracterización de los diferentes enzimas proteolíticos, basada en la región del pH en la que se obtiene la actividad enzimática óptima. Los enzimas de orígenes diferentes pueden producir la misma acción sobre un substrato simple, pudiendo, sin embargo, ser de naturaleza esencialmente diferente. Por lo tanto, algunos investigadores han tratado de clasificar los enzimas proteolíticos, estudiando su comportamiento frente a varios inhibidores proteolíticos. De esta manera, se pensó que sería posible diferenciar entre enzimas proteolíticos con acción idéntica sobre substratos simples. Esta interacción proporciona una clasificación más detallada de los enzimas proteolíticos, y mediante este método ha sido posible demostrar la complejidad de las preparaciones enzimáticas que anteriormente se supuso que eran puras. Como nuestro conocimiento de la especificidad de las proteasas está lejos de ser completo, se han intentado también otros medios para clasificar estos enzimas, pero, sin embargo, están sujetos a cierta crítica. Aunque los enzimas proteolíticos han sido objeto de muchas investigaciones desde 1932, la mayor parte de los datos disponibles sobre este sistema enzimático han

282234

12F



sido obtenidos con preparaciones crudas, no fraccionadas y parcialmente inactivadas. Se han efectuado relativamente pocos intentos para determinar las cantidades absoluta y relativa de enzimas individuales.

5 Los enzimas proteolíticos de los mohos parecen ser excesivamente numerosos, aunque nuestra información referente a ellos es muy escasa en comparación con nuestro conocimiento presente de los enzimas animales. Sin embargo, ha resultado evidente que el contenido en enzimas varía tanto entre miembros del mismo género, como entre mohos de géneros diferentes. El medio en el que crecen los mohos y el período de incubación, tienen un importante efecto sobre la cantidad de enzima formado.

10

15 El estudio relativamente inexplorado de las proteasas de mohos, parece estar muy relacionado con las grandes dificultades para el aislamiento y fraccionamiento de los diferentes enzimas. Para la separación de las proteasas se han presentado varios métodos, pero la mayor parte de ellos parecen tener ciertos fallos. La purificación de los enzimas implica problemas muy delicados e intrincados. Algunos de los enzimas proteolíticos son inestables y pierden fácilmente su actividad; por consiguiente, su purificación debe ser realizada con gran cuidado y en condiciones especiales y muy limitadas. Además de esto, existe otro importante problema debido al hecho de que cada enzima es estable solamente en condiciones limitadas, las cuales difieren de enzima a enzima. Por lo tanto, cada enzima tiene su propio requerimiento para una purificación satisfactoria con un buen rendimiento, habiéndose adoptado unos pocos procedimientos de rutina. Estos métodos usua-

20

25

30

282234



les de purificación provocan siempre la acumulación de algunas impurezas junto con la proteasa. Con el fin de obtener un efecto de purificación satisfactorio, la purificación debe realizarse en condiciones estrictas, que reducen notablemente el rendimiento de las diferentes proteasas.

Un objeto de la presente invención es el aislamiento y purificación de proteasas producidas mediante métodos microbiológicos.

Otro objeto es efectuar una separación y purificación de enzimas proteolíticos, sin ninguna pérdida apreciable de sustancia y de actividad.

Un objeto más de la presente invención es la fabricación de preparaciones para el tratamiento de heridas infectadas, mal curadas o cerradas en falso, o coágulos de sangre y oclusiones en las venas y arterias del cerebro y corazón, entre otros.

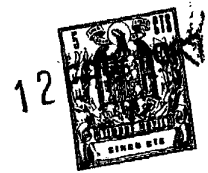
Otro objeto más de la invención es obtener una preparación para la disolución y eliminación de las obstrucciones y obstáculos del sistema vascular, provocados por la precipitación de sustancias de origen proteínico, o de otro origen, en el sistema vascular.

Otras ventajas y objetos más, se muestran en la siguiente exposición y reivindicaciones.

La presente invención será mejor explicada mediante las figuras adjuntas, de las cuales

La figura 1A muestra la actividad en gelatinasa de la mezcla de proteasa cruda, en función del pH;

La figura 1B muestra la actividad en hemoglobinasas de la mezcla de proteasa cruda, como función del pH;

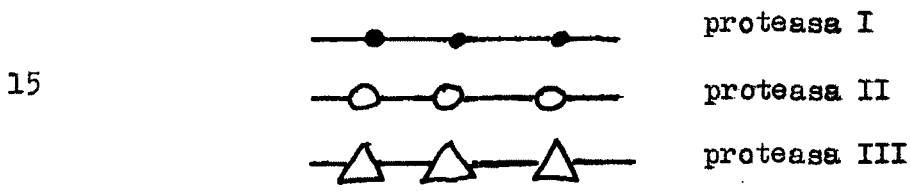


282234

La figura 10 muestra la actividad en caseinasa de la mezcla de proteasa cruda, como función del pH;

La Figura 2 ilustra la curva de fraccionamiento obtenida en la cromatografía de la mezcla de proteasa cruda sobre dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa). En esta figura la línea continua representa la absorción de luz a 280 m μ . Las zonas sombreadas representan la actividad en caseinasa relativa, a pH 6,0;

La figura 3 indica la adsorción de las diversas proteasas I, II y III inclusive, sobre la carboximetilcelulosa como función del pH, en la que se determinó lo completo de la adsorción, como alteración a pH = 6,0 de la actividad caseinasa de la solución.



La figura 4 expone en líneas generales cómo se realiza la adsorción selectiva y la separación sobre carboximetilcelulosa.

Los métodos para la purificación de proteasas, que son protegidos por la presente invención, pueden ser utilizados para la separación y aislamiento de los enzimas proteolíticos de líquidos de cultivo obtenidos mediante la incubación de diversos mohos.

De acuerdo con esta invención, los enzimas proteolíticos se aíslan y separan mediante un procedimiento que consiste en poner en contacto una solución de las proteasas, posiblemente purificada previamente, con un intercambiador de iones, seleccionado del grupo que consiste en

282234



5 carboximetilcelulosa y carboximetildextrano (CM-Sephadex, Pharmacia), a un pH dentro del intervalo de 2,5 a 8,5, y en eluir las proteasas así adsorbidas, poniendo en contacto el material intercambiador de iones con una solución eluyente tamponada hasta un pH más elevado que aquel a que fueron adsorbidas las proteasas.

10 El material de partida está constituido, de acuerdo con una realización, por las proteasas obtenidas mediante el cultivo de mohos seleccionados del grupo que comprende especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillia* y *Rhizopus*.

15 La solución que contiene proteasa, obtenida en el cultivo del moho, se somete, de acuerdo con otra realización ventajosa, a una precipitación preparatoria con tanino, de cuyo precipitado se elimina subsiguientemente el tanino mediante extracción con un disolvente adecuado.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se separan uno de otro los enzimas proteolíticos, cuyas propiedades serán descritas con más precisión posteriormente y cuyos enzimas se denominan proteasa I, proteasa II y proteasa III, respectivamente, mediante un procedimiento que comprende someter la solución de cultivo filtrada, obtenida mediante cultivo sumergido del *Aspergillus oryzae* hasta la iniciación de la esporulación o formación de esporas, a una purificación previa mediante la precipitación con tanino, de las proteínas que incluyen las proteasas. Después de esto se elimina el tanino con acetona, después de lo cual se disuelve el resto en agua y se ajusta el pH de la solución a 5,0, poniendo
25
30 en contacto la solución que contiene proteasa así obteni-

282234

12 F



da, con una carboximetilcelulosa intercambiadora de catio-
nes ajustada a un pH igual. La carboximetilcelulosa, jun-
tamente con la proteasa I adsorbida sobre ella, se separa
de la solución, la cual se ajusta, seguidamente, a pH 4,5
5 y se pone en contacto con carboximetilcelulosa ajustada a
un pH idéntico, después de lo cual se separa de la solu-
ción el material celulósico juntamente con la proteasa II
adsorbida sobre él, cuya solución se ajusta finalmente a
pH 3,0 para el aislamiento de la proteasa III, y se pone
10 en contacto con carboximetilcelulosa ajustada al mismo va-
lor de pH, se separa después de la solución la carboxime-
tilcelulosa juntamente con la proteasa III adsorbida, se
eluyen seguidamente por separado las proteasas puras I,
II y III de los respectivos materiales intercambiadores
15 de cationes, lavando con soluciones tamponadas, cuyos pH
son superiores a aquéllos a que fueron adsorbidas las pro-
teasas respectivas.

La presente invención protege, también, los enzi-
mas proteolíticos purificados obtenidos, proteasa I, pro-
20 teasa II, proteasa III que muestran las siguientes carac-
terísticas:

Proteasa I: Un enzima proteolítico que consiste
en una proteína uniforme, la cual es activa contra la fi-
brina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, y
25 que está parcialmente inhibida mediante suero, pero no me-
diante inhibidores de soja, y que es estable dentro del
intervalo de pH 4,5 a 9, muestra actividad dentro del in-
tervalo de pH 6,5 a 10,0, y tiene su actividad máxima a
un pH 8,0 y su temperatura óptima a 47°C, y es adsorbida
30 sobre carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 mi-

282234

12F



liequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa a pH 5,5, desde un tampón de fosfato 0,01 M (0,01 molar), y puede ser eluída de ésta mediante un tampón de fosfato 0,05 M (0,05 molar) a un pH 7,0.

5 Proteasa II: Un enzima proteolítico que consiste en una proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es parcialmente inhibida por suero, pero no por inhibidores de soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 4,0 a 10,5, que muestra actividad dentro del intervalo de pH de 3,5 a 11, y que tiene su actividad máxima a un pH 6,3 y su temperatura óptima a 50°C, y que es adsorbida sobre carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa a un pH 4,5, desde un tampón de fosfato 0,01 M, y que puede ser eluída de ésta mediante un tampón de fosfato 0,05 M.

15 Proteasa III: Un enzima proteolítico que consiste en una proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es inhibida por suero pero no por inhibidores de soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 2,3 a 6,5, que muestra actividad dentro del intervalo de pH de 2,0 a 11,0 y que tiene su actividad máxima a pH 5,0 y su temperatura óptima a 42°C, y que es adsorbida sobre carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa a pH = 3,0 desde un tampón de fosfato 0,01 M, y que puede ser eluída de ésta mediante un tampón de fosfato 0,05 M a un pH 6,0.

25 La invención se ilustrará a continuación mediante



282234

12 FEB

una descripción de la purificación, ensayo y uso clínico de los enzimas obtenidos del *Aspergillus oryzae*. Esta memoria no trata de limitar la invención, sino que se ha hecho solamente para la ilustración de una realización preferida de la presente invención.

5 La solución de proteasa cruda obtenida mediante cultivo sumergido, contiene además de las proteasas y otros enzimas, diversas impurezas, tales como sustancias orgánicas de alto peso molecular que incluyen polisacáridos, glucoproteínas, nucleoproteínas, materias colorantes, etc, y que son los productos metabólicos y autolíticos de los microorganismos utilizados, juntamente con sustancias de bajo peso molecular, tales como compuestos inorgánicos, que pueden ser una parte del medio de cultivo o derivados de él. Aunque las actividades de los enzimas que hidrolizan las proteínas fueron suficientemente elevadas para ser exáctamente medidas, la concentración total de proteína era demasiado baja para una purificación eficaz con procedimientos de rutina, tales como la salificación con sulfato amónico o la precipitación con disolventes orgánicos.

15 Se han ensayado varios métodos y se ha iniciado la mejor purificación mediante la precipitación selectiva con tanino de las proteínas que incluyen los enzimas proteolíticos, acompañada por la eliminación del tanino mediante lavado con acetona. Los factores principales que determinaron la eficacia de la precipitación de las proteasas, fueron la concentración del tanino, el pH y la temperatura.

20 La relación entre la concentración de tanino y la

282234

12



5 cantidad de proteasa precipitada, y la dependencia del
rendimiento respecto del pH y de la temperatura, fueron
determinados mediante ensayos preliminares. Sobre la base
de los resultados obtenidos, se adoptó el siguiente método
para la concentración de la mezcla proteínica que contenía
proteasa.

10 El filtrado de cultivo, obtenido a partir del cul-
tivo cosechado, fue ajustado a un pH 5,5. Se obtuvo una
precipitación de las proteasas casi cuantitativa, median-
te la adición de tanino hasta una concentración final de
3,0 gramos de tanino por 1000 ml de la solución (filtrado).
Después de un reposo no inferior a 2 horas a la temperatu-
ra ambiente, se aisló el precipitado mediante centrifuga-
ción, y se liberó de tanino mediante dispersiones repeti-
das en acetona, centrifugación y finalmente secado en un
15 desecador. La mezcla cruda de proteasas así obtenida, era
muy susceptible de una mayor purificación. El polvo seco
conservaba su actividad proteolítica durante más de un
año. Era fácilmente soluble en agua y soluciones salinas,
20 y, de esta manera, fue posible preparar soluciones de pro-
teasa más de 2000 veces más activas que la solución origi-
nal.

25 Se demostró que la mezcla de proteasa cruda así
obtenida y originada a partir del cultivo del *Aspergillus*
oryzae, contenía tres proteasas. Estas proteasas tienen
una especificidad diferente frente a distintos substratos,
lo cual se pone en evidencia por las curvas de las figu-
ras 1A, 1B y 1C. Mediante estas figuras se demuestra en
La figura 1A. La actividad gelatinasa estimada co-
30 mo la reducción de la viscosidad relativa de una solución

282234

12F



al 5% de gelatina en un tampón de Britton-Robinson de un pH apropiado, después de un período de digestión de 5 minutos a 37°C;

5 En la figura 1B. La actividad hemoglobinasasa estimada como la hidrólisis de una solución aproximadamente al 2% de hemoglobina desnaturalizada por urea después de una incubación durante 10 minutos a 37°C.

10 El aumento de la densidad óptica de un filtrado en ácido tricloroacético, se utilizó como medida de la actividad proteasa;

15 En la figura 1C. La actividad caseinasa, determinada mediante la velocidad de hidrólisis de una solución de caseína al 1,5% en un tampón de Britton-Robinson, después de una incubación durante 30 minutos a 37°C. El aumento de la densidad óptica de un filtrado en ácido tricloroacético, se utilizó como medida de la actividad proteasa.

20 El amplio máximo de pH para la digestión de la gelatina, indicó la posibilidad de que hubiera presentes más de un enzima. El efecto del pH sobre la velocidad de hidrólisis de la caseína, sugirió que había presentes por lo menos tres proteasas. Sin embargo, la caseína que es insoluble a un pH de 4 a 5, no era un substrato perfecto, pudiendo ser falsa la existencia evidente de una proteasa
25 con un óptimo a un pH de aproximadamente 3. Cuando se utilizó la hemoglobina desnaturalizada como substrato, la curva de actividad-pH difería grandemente de la obtenida con la caseína y la gelatina. En su digestión estaban implicados también varios enzimas.

30 Los enzimas proteolíticos son sustancias relativa

282234



mente frágiles, con tendencia a experimentar desnaturalización e inactivación en condiciones inadecuadas. Por lo tanto, es aconsejable señalar los límites de la estabilidad de la mezcla de enzimas proteolíticos, especialmente con respecto al pH, de tal manera que se sepa la amplitud de condiciones dentro de las que deben efectuarse las operaciones. Los enzimas proteolíticos producidos por el *Aspergillus oryzae* eran estables a la temperatura ambiente en el margen de pH 4,0 a 6,5, y podrían ser destruidos irreversiblemente a uno o a ambos lados de este margen de pH. Se ensayó la existencia de una destrucción irreversible mediante la exposición de los enzimas a un margen de valores de pH durante un período de tiempo definido, antes de medir la actividad a un pH en el cual son estables.

La cantidad de las diferentes proteasas fue estimada mediante el estudio del efecto del pH sobre su inactivación. La contribución en tantos por ciento de los enzimas individuales a la actividad proteolítica total a pH 6,0, fue estimada con caseína como sustrato. La correlación de los valores obtenidos a pH 3,0 y 9,0, se efectuó en primer lugar después de estudiar las propiedades de los componentes purificados. Los resultados se indican en la Tabla I a continuación.

Tabla I

Componente	Proteasa I	Proteasa II	Proteasa III
pH 3,0	27,0	25,0	48,0
pH 9,0	29,0	24,0	47,0

282234

12F



Las actividades parciales fueron estimadas mediante la separación de las proteasas por electroforesis continua a pH 4,5, 6,0 y 8,5. Se analizaron las fracciones mediante el método de la caseinasa a un pH de 6,0 y 7,4.

5 En la Tabla II a continuación, se expresan las cantidades en tanto por ciento de actividad total.

Tabla II

Componente	Proteasa I		Proteasa II		Proteasa III	
pH de la caseinasa	6,0	7,4	6,0	7,4	6,0	7,4
Electroforesis a pH 4,5	29,0	66,0	23,5	34,0	47,5	---
a pH 6,0	28,5	65,0	24,0	35,0	47,5	---
a pH 8,5	---	65,0	---	35,0	---	---

282234

12F



282234

12 FEB



Es evidente que las cifras de la Tabla II se corresponden muy bien con las que se mencionan en la Tabla I, a pesar del hecho de que los métodos usados son muy diferentes.

5 Los estudios electroforéticos han demostrado claramente la presencia de tres proteasas en la preparación cruda obtenida a partir del *Aspergillus oryzae*. Sin embargo, la mezcla proteínica era mucho más completa de lo que fue revelado por los estudios electroforéticos. La electroforesis repetida a otros valores de pH, reveló que las
10 diferentes fracciones obtenidas no representaban proteínas simples, sino una mezcla compleja. Sin embargo, las proteasas podían ser separadas y cuantitativamente estimadas.

15 Aunque los métodos electroforéticos son adecuados para finalidades analíticas, no pueden ser utilizados en operaciones en gran escala.

Sin embargo, se ha visto ahora que se puede utilizar una cromatografía intercambiadora de iones para el fraccionamiento y purificación de los enzimas proteolíticos, aun cuando las dificultades que se originan de la estructura complicada de estos sistemas sean de un carácter
20 y extensión muy diferentes de las que tienen lugar en relación con la cromatografía de mezclas de sustancias menos complicadas.

25 La inestabilidad de los enzimas mismos, limita severamente la elección de los agentes de elución e impone condiciones especiales de operación, tales como temperatura baja y margen de pH restringido. La limitación más importante de las resinas intercambiadoras de iones, es su
30 fijación irreversible de las proteínas. Esto puede ser el

282234

12



5 resultado de la formación de demasiados enlaces entre la proteína y el adsorbente, tantos que no tenga lugar la disociación simultánea de todos ellos excepto en condiciones destructivas para la configuración original de la molécula.

10 Entre los tipos de adsorbentes de que se dispone ahora, los de base de celulosa y dextrano han demostrado ser los mejores, tanto con respecto a su resistencia a la circulación relativamente escasa, como a su fijación relativamente floja de las proteínas. Estas sustancias se encuentran disponibles con propiedades tanto intercambiadoras de aniones como intercambiadoras de cationes, habiéndose utilizado ambos tipos en la cromatografía de las proteasas. La proteína adsorbida está firmemente unida, y la
15 formación de los múltiples enlaces electrostáticos entre la proteína y el adsorbente tiene lugar indudablemente en el curso de la adsorción. La elución puede ser efectuada mediante la variación del pH, para reducir el número de cargas sobre la proteína o adsorbente, o elevando la concentración salina para competir con las cargas existentes.
20

Las mezclas de proteasa cruda han sido cromatografiadas en columnas DEAE (3,0 x 40 cm) tamponadas a pH 6,0 con tampón de fosfato 0,01 M, para efectuar lo cual se aplicaron a la columna 2 gramos de sustancia dializada, disueltos en 15 ml de una solución tampón, y para lo cual
25 el volumen de fracción fué de 0,5 ml y la temperatura de 4°C. Los resultados de esta cromatografía se ilustran gráficamente en la figura 2. En esta figura la línea sólida representa la adsorción a 280 m/u. Las secciones radiadas muestran la relativa actividad caseinasa a un pH 6,0.
30

282234

12F



La concentración salina del agente de elución se varía por etapas en los puntos marcados de 1 a 5 inclusive en el gráfico, de acuerdo con las cifras que se indican a continuación.

- 5
- 1) Tampón de fosfato 0,01 M
 - 2) " " 0,10 M
 - 3) " " 0,25 M
 - 4) " " 0,50 M
 - 5) " " 0,50 M + cloruro sódico 0,50 M

10

Estos experimentos demostraron que el producto crudo se separa en, por lo menos, 8 crestas distintas, designadas de la A a la H por orden de su elución. El curso de la elución de las proteínas fué seguido midiendo la densidad óptica de las fracciones a 280 m/ μ . Se determinó

15

también la actividad proteolítica de las fracciones efluentes. En el programa de elución descrito, tanto en la columna analítica como en la de preparación, fue muy buena la reproducibilidad de la posición de las crestas cromatográficas. Al volver a cromatografiar, se eluyó cada una

20

de las fracciones de proteasa como una sola cresta para la misma concentración salina que en el primer experimento. El comportamiento después de volver a cromatografiar, indicó que tuvo lugar un verdadero fraccionamiento.

25

Los estudios anteriores han demostrado la presencia de tres diferentes proteasas, lo cual fue revelado también mediante la cromatografía intercambiadora de ión. Sin embargo, la mezcla proteínica era más completa que lo revelado por los estudios electroforéticos. Los tres enzimas proteolíticos a que se ha hecho referencia antes como

30

proteasa I, II y III, se encontraron en las crestas A, E




282234

12 FEB



5 y G, respectivamente. También se encontraron proteínas en las otras crestas, pero éstas no han sido caracterizadas. Al realizar la separación a una temperatura baja (4°C), se recogió aproximadamente el 85 a 95% de la actividad proteolítica aplicada a la columna.

10 La cromatografía intercambiadora de iones descrita, podría ser utilizada para la separación de cantidades de material bastante grandes, pero el método lleva mucho tiempo y no es adecuado para separaciones a escala industrial. Sin embargo, esto puede conseguirse con un procedimiento discontinuo de etapas múltiples, utilizando un intercambiador de cationes del tipo CM-celulosa. De esta manera, se puede fraccionar la preparación cruda sin ninguna pérdida apreciable de proteasas ni de su actividad. La separación posterior de las proteasas y de las otras proteínas puede efectuarse, a continuación, en columnas separadas del mismo tipo y bajo condiciones diferentes, o con otros intercambiadores celulósicos de iones.

15 Las proteasas I, II y III son cuantitativamente adsorbidas sobre la carboximetilcelulosa intercambiadora de cationes, a valores de pH inferiores a 5,5 y 3,0 respectivamente, lo cual se demuestra mediante la figura 3, en la que el gráfico  representa el curso de la adsorción de la proteasa I, el gráfico  representa el curso de la adsorción de la proteasa II, y el gráfico  representa el curso de la adsorción de la proteasa III.

25 En general, la separación se realiza de la siguiente manera: Se eligieron como material de partida preparaciones de proteasa precipitadas con tanino, disolviéndose

30

282234



éstas en agua a un pH inferior a 6,5 hasta una concentración final de 2 gramos por litro. La solución se ajustó a un pH 5,5 y se agitó, seguidamente, con el intercambiador de catión derivado de polisacárido, a la temperatura ambiente. Después de equilibrar con la primera tanda de resina, se separó la solución por centrifugación. Aunque la combinación intercambiadora de proteína fue separada del grueso de la solución de reacción por centrifugación, con servó, no obstante, grandes cantidades de solución, la cual contenía, como es natural, proteínas sin reaccionar. El lavado con tampón de fosfato 0,01 M, de pH 5,5, eliminó el material no adsorbido, sin eluir las proteínas adsorbidas. Las soluciones reunidas fueron ajustadas a pH 4,5, y se repitió el procedimiento a este pH, para aislar la proteasa II y, seguidamente, a pH 3,0 para aislar la proteasa III.

Considerando que el intercambiador de iones debe estar presente en una cantidad suficiente para la adsorción de todas las proteasas de la solución, el derivado carboximetilo del polisacárido ha sido utilizado en un gran exceso.

La elución, igual que la adsorción, como se podría esperar, era una función del pH. La elución de las proteasas se realizó mediante la agitación con tampones de pH mayores que los de la etapa de adsorción. Con el fin de evitar la inactivación de las proteasas debida a fuertes variaciones de pH, se encontró que lo más satisfactorio era utilizar tampón de fosfato 0,05 M de pH 7,0 para la elución de la proteasa I y II, y un tampón de pH 6,0 para la proteasa III. La elución repetida dio como re

282234

12F



sultado una recuperación de más del 90% de la actividad proteolítica. Se obtuvo una elevada recuperación total con las preparaciones que contenían cantidades de proteasas, tanto pequeñas como grandes. El hecho de que las proteasas podrían ser eluidas en condiciones favorables para los enzimas, fue responsable de este elevado rendimiento. Por ejemplo, la proteasa III que era inestable a un pH superior a 6,5, se eluyó a un pH de 6,0. Otro factor que favoreció la utilidad del método en la investigación sobre enzimas, fue la rapidez con que tuvo lugar la adsorción y elución. El procedimiento se puede utilizar también en pequeña escala, como método analítico.

En la mayor parte de los casos, fue necesario concentrar los eluatos para su almacenamiento o su purificación posterior mediante otro procedimiento. Así, las proteasas podrían ser precipitadas con tanino como se ha descrito antes, o dializadas y, seguidamente, liofilizadas.

Se puede comprobar la eficacia del fraccionamiento y purificar más los productos mediante cromatografía sobre dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa) o dietilaminoetildextrano (DEAE Sephadex, Pharmacia). Las condiciones elegidas fueron las mismas que se han descrito arriba.

Se podría demostrar que se obtuvo una proteasa I muy purificada, mediante la adsorción selectiva sobre CML-celulosa. El producto contenía solamente cantidades muy pequeñas de una proteína inactiva. Las proteasas II y III estaban también muy purificadas, pero contenían todavía otros componentes proteínicos. Sin embargo, se puede conseguir una purificación satisfactoria mediante la cromatografía sobre derivados dietilaminoetílicos de los polisac-

282234

12 FEB



cáridos mencionados arriba.

Ejemplo 1. Producción de enzimas.

5 Los enzimas de *Aspergillus oryzae* se obtuvieron
mediante cultivo sumergido sobre un medio rico en proteí-
nas y carbohidratos. Se obtuvo un rendimiento máximo cuen-
do el medio contenía de 1 a 1,5% de proteínas procedentes
de fuentes tales como harina de soja o harina de cacahuete
y, además, de 2 a 4% de carbohidrato, y sales de magnesio
10 y fósforo. El pH inicial del medio esterilizado fue de
6,5 a 7,0. La actividad enzimática óptima fue alcanzada,
por lo general, en el espacio de 3 a 4 días.

Tan pronto como tuvo lugar una abundante formación
de esporas, todos los enzimas proteolíticos abandonaron
15 su previo estado intracelular y pudieron ser recuperados
cuantitativamente del medio. La recogida debe tener lugar
entonces, ya que se observó una disminución considerable
de la potencia enzimática al proseguir la incubación.

El filtrado de cultivo obtenido del cultivo cose-
20 chado fue concentrado mediante precipitación con tanino.

Ejemplo 2.- Precipitación de enzimas proteolíticos
por el tanino

25 Sobre la base de los resultados presentados arri-
ba, se realizó como sigue la concentración de las proteí-
nas.

El filtrado de cultivo se ajustó a un pH 5,5. El
grueso de las proteínas se precipitó, seguidamente, me-
diante la lenta adición de una solución al 10% de tanino,
30 hasta la concentración final de 3,0 gramos de tanino por



282234

1000 ml de filtrado. Se formó un gran precipitado, el cual, después de depositarse durante por lo menos 2 horas, fue aislado mediante centrifugación y fue liberado del tanino por dispersión repetida en acetona en los recipientes de centrifugación, volviendo a centrifugar, y secando, finalmente, a vacío. Se encontró que los enzimas proteolíticos conservaban su actividad enzimática después del proceso de precipitación y regeneración. Se obtuvo una recuperación del 80 al 100% de la actividad proteolítica, calculada sobre la base del ensayo del filtrado de cultivo original.

Ejemplo 3. Proceso de adsorción selectiva para la separación de las proteasas.

Se ha encontrado que se podían aislar los enzimas proteolíticos de una solución de proteasa cruda, sin ninguna pérdida apreciable de proteasas ni de su actividad, utilizando un procedimiento de adsorción-elución.

El método que se describe en la figura 4, fue no solamente adecuado para la separación de las proteasas entre sí, sino que también fue ventajoso como método para eliminar la mayor parte de las impurezas que acompañaban a las proteasas. El método era rápido y también adecuado para ser realizado en escala industrial. El adsorbente utilizado fue una Cm-celulosa intercambiadora de cationes, preparada de acuerdo con el método de Peterson y Sober con polvo de celulosa Whatman y ácido cloroacético, o se obtuvo de los proveedores de equipos de laboratorio. Todos los lotes diferentes, que contenían 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de CM-celulosa,

282234



se comportaron de la misma manera durante el proceso de se
paración. Era muy importante el que el pH de la resina
fuera el mismo que el de la solución de proteasa a tratar
durante la operación. Por lo tanto, los diferentes lotes
5 a utilizar fueron tamponados hasta el pH apropiado, de la
misma manera que se describió arriba para la DEAE-celulo-
sa.

Mediante el procedimiento se podía tratar cual-
quier solución de proteasa cruda de *Aspergillus oryzae*,
10 por ejemplo, un líquido de cultivo del moho, obtenido por
cualquier método de cultivo sumergido. Sin embargo, en la
mayor parte de los casos se han utilizado mezclas de pro-
teasa cruda, obtenidas mediante precipitación con tanino.

Se disolvieron 500 gramos de una mezcla de proteas
15 sa precipitada con tanino, en 250 litros de agua o en un
tampón de fosfato 0,01 M de pH 5,5. En caso necesario, se
ajustó el pH a 5,5 y, seguidamente, se añadieron 500 gra-
mos de CM-celulosa apropiadamente equilibrada hasta el
mismo pH. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente du-
20 rante una hora y, seguidamente, se separó el complejo in-
tercambiador de proteínas, mediante centrifugación del
grueso de la solución en una centrífuga de cesta. Sin em-
bargo, el intercambiador de celulosa conservó grandes can-
tidades de la solución que contenía proteínas sin reaccio-
25 nar y otras sustancias.

Por lo tanto, se eliminó el material no adsorbido
mediante lavado con tampón de fosfato 0,01 M de pH 5,5.

La solución reunida fue ajustada a pH 4,5 con áci-
do clorhídrico. La segunda proteasa fue adsorbida sobre
30 500 gramos de CM-celulosa tamponada a pH 4,5. Todo el pro



12

282234

cero se realizó como se ha descrito arriba. A continuación, se ajustó la solución a pH 3,0 y se añadió otro lote de 500 gramos de CM-celulosa tamponada a pH 3,0, para adsorber el último componente de proteasa de la mezcla.

5 La recuperación de las proteasas desde el intercambiador de iones podía ser efectuada mediante el uso de cualquier tampón de un pH superior al utilizado en la operación de adsorción. En la mayor parte de los casos se eluyeron las dos proteasas primeramente adsorbidas, con un
10 tampón de fosfato 0,05 M de pH 7,0, y la última con un tampón de pH 6,0. La elución repetida dio como resultado una recuperación de más del 90% de las proteasas y de su actividad. Después de la elución, se regeneró la CM-celulosa mediante lavado con una solución de cloruro sódico e
15 hidróxido sódico 0,5 M, con respecto a ambos compuestos, y, seguidamente, con agua hasta neutralidad.

El proceso arriba mencionado solo, fue suficiente cuando la única necesidad consistía en separar las proteasas una de otra, y de la mayor parte de las impurezas.
20 Sin embargo, la purificación posterior de las proteasas pudo conseguirse mediante cromatografía intercambiadora de iones sobre DEAE-celulosa.

Esta purificación posterior fue realizada de la siguiente manera:

25 Ejemplo 4. Cromatografía intercambiadora de iones.

La dietilaminoetil celulosa (DEAE-) fue preparada, tanto a partir de polvo de celulosa mediante el procedimiento de Peterson y Sober, como obtenida de los proveedores de equipos de laboratorio. Los adsorbentes intercam-
30

282234

12



biadores de aniones utilizados, tenían una capacidad total de intercambio de 0,4-0,6 miliequivalentes por gramo de peso en seco. Antes de rellenar la columna, se suspendió la DEAE-celulosa en unas 10 veces su volumen de tampón de fosfato 0,5 M del pH apropiado, y se agitó bien a la temperatura ambiente durante una hora. Se dejó sedimentar la celulosa durante media hora, después de lo cual se decantó el líquido sobrenadante, a fin de eliminar las partículas más pequeñas. Seguidamente, se lavó el adsorbente varias veces con tampón de fosfato 0,01 M de pH 6,0, el tampón de partida, y se volvió a suspender, seguidamente, en el mismo tampón. Después de equilibrar durante la noche con este tampón, se vertió una suspensión del adsorbente en las columnas de vidrio para cromatografía de tamaño apropiado para el uso previsto. El adsorbente se dejó sedimentar por gravedad y, seguidamente, se densificó más mediante presión de aire, hasta alcanzar una altura de columna constante. Para asegurar el equilibrio completo, se lavaron las columnas con 25-30 volúmenes de tampón, o hasta que el pH del efluente fue el del tampón que se estaba introduciendo. Antes de ser cromatografiados, se dializaron los productos frente al tampón de partida. La mayor parte de las separaciones descritas se realizaron con elución en etapas, según puede verse en la figura. Las fracciones se recogieron con un colector de fracción de volumen constante.

Se siguió el curso de la elución de las proteínas, midiendo la densidad óptica a 280 milimicras. El programa de elución podría ser también más fácilmente estimado, controlando el eluyente mediante un medidor de re

282234



gistro y controlador de absorción de luz ultravioleta. De esta manera, se obtuvo un registro gráfico continuo de la absorción a 254 m μ de la solución de salida, sin necesidad de recoger y analizar fracciones individuales.

5 Las fracciones que comprendían crestas discontinuas fueron mezcladas, dializadas frente a agua fría, y liofilizadas o precipitadas directamente con tanino. Los productos se analizaron mediante electroforesis con papel, y se ensayó su actividad proteolítica específica. También
10 se concentraron las fracciones más pequeñas mediante ultrafiltración a través de una membrana de colodión, según Mies. La bolsa de colodión fue suministrado por Membranengesellschaft, Göttingen.

15 La DEAE-celulosa se regeneró después de su uso, mediante lavado con una solución de cloruro sódico e hidróxido sódico, 0,5 M con respecto a ambos de los compuestos mencionados, y, seguidamente, con grandes volúmenes de agua hasta pH neutro.

20 Se ha buscado durante mucho tiempo un agente eficaz para detener la formación continua de depósitos intravasculares de fibrina, y también para inducir la recanalización del vaso, mediante la destrucción total o parcial del trombo ya formado. Para evitar la propagación de los coágulos se pueden utilizar verdaderos agentes anticoagulantes, tales como la heparina, pero los trombos ya forma
25 dos no son destruídos, siguiéndose variaciones irreversibles de los vasos y de los tejidos. Por lo tanto, la fibrinolisis in vivo es una etapa importante en el tratamiento de la trombosis.

30 Los productos tales como la plasmina y la estrep

282234



toquinasa, han dado resultados prometedores, pero algunas veces contradictorios, y ninguna de estas sustancias puede considerarse que llena todos los requerimientos de un agente potencialmente trombolítico. Sin embargo, la proteasa I es una sustancia que tiene una actividad fuertemente proteolítica, fibrinolítica, así como anticoagulante, habiéndose obtenido resultados muy buenos con este producto suministrado solo o en combinación con una o ambas proteasas II y III.

Las proteasas I y II y, también en algún grado la proteasa III, pueden disolver rápidamente los coágulos de fibrina de origen humano o animal. Los coágulos de plasma son también descompuestos, pero, en este caso, se puede demostrar una actividad inhibidora del suero. En el último caso, debe utilizarse una cantidad de enzima mayor para obtener una disolución tan rápida como en ausencia del suero.

Se han efectuado extensos experimentos, especialmente con la proteasa I, habiéndose demostrado una eficaz lisis de los coágulos y recanalización de los vasos. Mediante el uso de diferentes métodos, por ejemplo, venografía, medidas de la disminución de radioactividad de un coágulo de fibrina- I^{131} , y, también, mediante la inspección visual directa del vaso afectado de trombosis, se ha demostrado la lisis de los coágulos. Se ha efectuado una gran serie de experimentos con conejos, gatos y perros, pudiéndose ver los resultados de los experimentos con los gatos, en la Tabla III.

Tabla III

La disolución del coágulo se demostró mediante venografía. El número de animales de cada grupo se expresa como tanto por ciento del número total.

Tratamiento	Tiempo en horas	No pasa el coágulo entero	Coágulo reducido		Sin coágulo
			No pasa	Pasa	
Control	3	100	0	0	0
	6	100	0	0	0
	48	100	0	0	0
Proteasa I, 1-4 mg/kg	3	80	8	12	0
	6	25	15	60	0
	48	0	0	40	60

282234



282234



Se han obtenido resultados similares mediante el uso de otros métodos y mediante experimentos con otros animales.

5 La actividad fibrinolítica de la proteasa I, sola o en combinación con proteasa II, fue muy aumentada por la heparina suministrada juntamente con las proteasas en una cantidad de 2 mg/kilo. El efecto de la heparina no es solamente como agente anticoagulante, sino que parece efectuar otro mecanismo todavía desconocido. El mismo efecto que la heparina ha sido mostrado, por ejemplo, mediante combinación de heparina y plasmina. En ningún caso ha sido posible encontrar una explicación del fenómeno. En la práctica, las proteasas debieran suministrarse en combinación con heparina, si no existen contraindicaciones contra el uso de la heparina.

10

15

La proteasa I y las combinaciones de algunas de las proteasas seleccionadas del grupo que consiste en proteasa I, proteasa II y proteasa III, no son activas fibrinolíticamente sobre el sistema plasminógeno-plasmina, y, por lo tanto, su empleo significa una gran ventaja en comparación con los productos tales como plasmina, estreptoquinasa y uroquinasa (activador plasminógeno aislado de la orina). La estreptoquinasa y la uroquinasa actúan indirectamente transformando el plasminógeno en plasmina. La disolución del coágulo es el resultado de la actividad lítica de la plasmina, que ha sido formada a partir del plasminógeno directamente adsorbido sobre la estructura de fibrina. La plasmina que circula en la corriente sanguínea no muestra ninguna, o despreciable, actividad lítica del coágulo. Después del tratamiento durante algún tiempo con

20

25

30



282234

un activador de plasminógeno, todo el plasminógeno ha sido transformado en plasmina, la cual es inactivada mediante inhibidores de suero. Un coágulo formado durante el tratamiento no contiene plasminógeno, y no puede, por lo tanto, ser eficazmente atacado por la administración de un activador. Esto ha constituido un gran problema durante mucho tiempo y es una complicación seria. Mediante tratamiento con proteasa I sola, o con una combinación de algunas de las proteasas I, II y III, se evitan estas complicaciones y puede disolverse también mediante estas proteasas un coágulo exento de plasminógeno. Estas enzimas no activan el sistema plasminógeno-plasmina. Las proteasas I, II y III son inhibidas por el suero, pero en un grado mucho menor que la plasmina, tripsina y otros enzimas proteolíticos, siendo también este hecho de gran ventaja para el uso de estas enzimas como agentes trombolíticos.

Las cantidades de las proteasas que han de ser administradas de acuerdo con la invención, para conseguir resultados positivos, dependen de la concentración de inhibidores de suero en el sujeto a tratar. Esta concentración debe calcularse a partir de los análisis del suero. Los enzimas deben suministrarse por vía intravenosa y con gran cuidado. La actividad proteolítica en la corriente sanguínea durante un tiempo prolongado, puede provocar una descomposición de diferentes componentes de la sangre y conducir a serias perturbaciones (esto es cierto también para el tratamiento con plasmina y estreptoquinasa). Por lo tanto, las proteasas han de ser suministradas en pequeñas cantidades, siendo sin embargo todavía activas debido,

282234



5 probablemente, a su circulación como complejo reversible con una proteína sanguínea, cuyo complejo puede ser disociado, pudiéndose unir después los enzimas liberados a las moléculas de fibrina, con las que tienen una mayor afinidad.

10 En la mayor parte de los casos una dosis adecuada consiste en aproximadamente 2 a 4 miligramos de proteasa I, o en una combinación que contiene la misma cantidad de proteasa II y 2 mg de heparina, todo ello calculado por kilo de peso del cuerpo. No puede advertirse disminución de la presión sanguínea y solamente ha sido demostrado un ligero aumento de la temperatura del cuerpo. Este último efecto depende de la actividad del enzima y de que no haya presentes pirógenos en la preparación utilizada.

15 La proteasa I, sola o en combinación con la proteasa II, muestra in vivo no solamente un efecto fibrinolítico, sino también una actividad antitrombínica pronunciada. Sin embargo, la plasmina y la tripsina a dosis más altas, si aceleran la formación de trombina a partir de la protrombina, y como esto será causa de una formación continua de depósitos de fibrina, los resultados de un tratamiento con estas dos sustancias serán muy perjudicados.

20 La proteasa I o una combinación de proteasas seleccionadas del grupo que consiste en proteasa I, II y
25 III, han demostrado ser extremadamente útiles para el tratamiento de diferentes tipos de heridas. El tejido muerto es rápidamente digerido por los enzimas, sin ningún daño para el tejido vivo, ni otros efectos secundarios indeseables. Anteriormente han sido utilizadas para esta finalidad,
30 sustancias tales como estreptoquinasa en combinación

282234

12



5 con estreptodornasa (Varidase), tripsina y algunos otros
enzimas proteolíticos. El efecto del Varidase depende de
la presencia de plasminógeno, el cual es activado por con-
versión a plasmina, teniendo por consiguiente esta prepa-
ración una utilidad muy limitada. La tripsina y la plasm
10 na son fuertemente inhibidas por el suero y su efecto es
pequeño. Además, debe aplicarse más enzima nuevo dentro de
intervalos cortos de tiempo para conseguir algún efecto.
La tripsina es también muy inestable en solución, aun cuan-
do haya sido estabilizada con sales de calcio. Debido a
este hecho, el uso de soluciones acuosas de tripsina para
el tratamiento de heridas, implica grandes dificultades.

15 La proteasa I o una mezcla de proteasas seleccio-
nadas del grupo que consiste en proteasa I, II y III, son
muy estables, tanto en solución como en ungüentos. Una so-
lución de los productos puede ser conservada a la tempera-
tura ambiente durante muchos días, sin ninguna pérdida de
actividad. Son estables durante un tiempo extremadamente
20 largo, en forma de polvo o de un ungüento que contiene un
sistema tampón, el cual, en contacto con los flúidos del
cuerpo mantendrá el pH en el valor de actividad máxima de
las substancias. Las proteasas descomponen rápidamente la
sangre coagulada, los exudados y los tejidos necróticos.
Sin embargo, son inactivas frente al tejido naciente, lo
25 cual es un requisito previo básico para su empleo en el
tratamiento de heridas.

30 Las proteasas tienen un efecto muy bueno sobre
los procesos purulentos y necróticos, por ejemplo, ulcus
cruis varicosum, gangrena diabética y arterioesclerótica,
heridas de decúbito, abscesos, y empiemas.



12

282234

En el tratamiento de heridas muy infectadas, es conveniente combinar este tratamiento con una terapia local con antibióticos. Las proteasas pueden ser mezcladas con diferentes antibióticos, tales como penicilinas naturales y semisintéticas, tetraciclina, tirotricina, canamicina, bacitracina, polimixina, trichomicina, y xantocilina y sus sales, sin ninguna reducción de la actividad proteolítica. La terapia combinada ha demostrado que procura resultados muy buenos.

10 Como se ha demostrado anteriormente para otros enzimas proteolíticos, todas las proteasas I, II y III, poseen una actividad antiinflamatoria típica que tiene un efecto favorable en todos los tratamientos con estos productos.

15 Las nuevas proteasas de acuerdo con la presente invención, están caracterizadas, por lo tanto, por las siguientes propiedades.

Propiedades comunes a las tres proteasas:

20 Son compuestos semejantes a las proteínas de composición uniforme, como se ha demostrado por electroforesis, utilizando soluciones tampón de acetato, fosfato, veronal y fosfato-borato.

25 Son fácilmente solubles en agua y en soluciones tampón.

Son precipitadas de sus soluciones por la adición de ácido tánico.

30 En forma de polvo seco, son estables y conservan su actividad proteolítica a la temperatura ambiente durante más de un año.



282234

Su espectro de absorción ultravioleta muestra que sus bandas de absorción principales, tienen lugar en la región asociada de manera característica con las proteínas y ácidos aromáticos.

5 Sus espectros infrarrojo corresponden a los de las proteínas y otros enzimas proteolíticos.

Son eficaces proteolíticamente y provocan la digestión de la gelatina y de la hemoglobina.

10 No hidrolizan significativamente el éster etílico de lisina.

Son completamente inactivadas a 60°C en menos de 2 minutos; más del 50% de su actividad inicial fue perdida a 50°C en el espacio de 20 minutos, mientras que la actividad disminuyó sólo muy lentamente a 40°C.

15 Su actividad no es afectada en absoluto, o sólo muy ligeramente, por los iones bario, calcio y magnesio. Solamente los iones de metales pesados, tales como iones cobre, níquel, cadmio y hierro, poseen un efecto inhibitor a concentraciones bajas.

20 El inhibidor de soja, ácido epsilon-amino caproico, cianuro potásico, y ácido iodoacético, no tienen efecto inhibitor de la actividad, o sólo un efecto insignificante.

25 Además de esto, las proteasas I, II y III poseen las siguientes propiedades y se diferencian una de otra como se evidencia en la Tabla IV.

Tabla IV

Propiedad	Proteasa I	Proteasa II	Proteasa III
<u>I pH de actividad óptima sobre</u>			
caseína	8,2(7,6-9,5)	6,8(6,3-6,8)	4,5
gelatina	9,0-9,5	6,3	
hemoglobina	7,6	6,8	
TAME	8,5	-	
<u>2 Temperatura proteolítica óptima</u>	50°C.	50°C.	45°C.
<u>3 Estable a 37°C durante 30 minutos a un pH de</u>	5,0-8,5	4,5-10,5	3,0-6,3
<u>4 Inhibición por:</u>			
iodo	no	ligera	fuerte
ácido ascórbico	ligera	muy fuerte	ligera
lauril sulfonato sódico	muy fuerte	no	fuerte
lauril amina	fuerte	fuerte	completamente inactivada
L-cisteína	no	fuerte	no
ácido etileno diamina tetraacético	no	muy fuerte	no
Suero humano	más que la proteasa II	menos que la proteasa I	-

2 2 2 3 4

12



Tabla IV (Continuación)

Propiedad	Proteasa I	Proteasa II	Proteasa III
5 <u>Actividad:</u>			
fibrinolítica	3-6 x tan eficaz como la proteasa II	1/3-1/6 tan eficaz como la proteasa I	-
fibrinogenolítica	considerablemente menos eficaz que la proteasa II; ninguna diferencia de actividad fibrinolítica y fibrinogenolítica.	Más eficaz que la proteasa I	-
caseinolítica	igual que la de la proteasa II	igual que la de la proteasa I	-
6 <u>Adsorción por los iones intercambiadores de ion</u>			
sobre carboxi metil celulosa (0,7-0,9 miliequivalentes/g) desde un tampón de fosfato 0,01 M	a pH de 5,5	a pH de 4,5	a pH de 3,0
elución desde el intercambiador mediante un tampón de fosfato 0,05 M.	a pH superior a 6,0, preferiblemente, a pH de 7,0	a pH de 6,5-7,0	a pH de 6,0

282234

12



Tabla IV (Continuación)

Propiedad	Proteasa I	Proteasa II	Proteasa III
7 <u>peso molecular</u>	36.000	-	95.000
8 <u>Constante de sedimentación</u>	-	3,3 unidades Svedberg (Determinada a pH=6,8 en tampón de fosfato 0,1 M, hecho 0,1 M con respecto al NaCl).	-

282234

12 FEB





12 FEB

282234

Como es natural, los expertos en la técnica pueden efectuar muchos cambios y variaciones en la preparación del inóculo, en el cultivo de los mohos que producen las proteasas, en el aislamiento de los enzimas proteolíticos, en su administración en la terapia humana y veterinaria, sin apartarse del espíritu de la invención, como se indica en la memoria y en las reivindicaciones adjuntas a la misma.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Suecia, el 8 de Noviembre de 1961, bajo el número 11.134/61, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15 N O T A

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

1. Un procedimiento para el aislamiento y separación selectivos de enzimas proteolíticos, caracterizado por que se pone en contacto una solución de las proteasas, posiblemente prepurificada, con un intercambiador de iones de carboximetilpolisacárido a un pH que cae dentro del intervalo de 2,5 a 8,5, y por que las proteasas así adsorbidas se eluyen poniendo en contacto el intercambiador de iones con una solución eluyente tamponada hasta un valor de pH superior o aquél en el cual fueron adsorbidas las proteasas respectivas.

282234

12 FEB



2. Un procedimiento para el aislamiento y separación selectivos de enzimas proteolíticos, especialmente los producidos en el cultivo de mohos, caracterizado por que una solución de las proteasas, posiblemente prepurificada, se pone en contacto, en etapas, con un intercambiador de iones carboximetil polisacárido, a un pH que está, de etapa en etapa, comprendido dentro del intervalo de 2,5 a 8,5, y por que la fracción de proteasa así adsorbida en cada etapa, es eluída poniendo en contacto el intercambiador de iones con una solución eluyente tamponada hasta un valor de pH superior a aquél en el que fue adsorbida la fracción de proteasa respectiva, purificándose más, si se desea, las proteasas así aisladas, mediante cromatografía con intercambiador de iones.

3. Un procedimiento para el aislamiento y separación selectivos de enzimas proteolíticos, caracterizado por que las proteasas obtenidas en el cultivo del *Aspergillus oryzae* son aisladas mediante adsorción sobre un intercambiador de cationes seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa y carboximetildextrano, a un pH que cae dentro del intervalo de 2,5 a 5,5, y por que los enzimas adsorbidos son eluídos a pH de 6,0 a 7,5.

4. Un procedimiento de acuerdo con el punto 3, caracterizado por que la adsorción se realiza sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa.

5. Un procedimiento para el aislamiento y separación selectivos de enzimas proteolíticos, caracterizado por que las proteasas que han sido producidas en el cultivo

282234



vo del *Aspergillus oryzae*, después de haber sido purificadas mediante precipitación con tanino, se ponen en contacto con una carboximetilcelulosa intercambiadora de cationes, a un pH que cae dentro del intervalo de 2,5 a 5,5, y por que las proteasas así adsorbidas se eluyen poniendo en contacto el intercambiador de iones con una solución tampón cuyo pH se ajusta a 6,0-7,5.

6. Un procedimiento de acuerdo con el punto 5, caracterizado por que la adsorción se realiza sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa.

7. Un procedimiento para una separación y aislamiento selectivos de proteasa I, proteasa II y proteasa III, desde soluciones que contienen por lo menos uno de estos enzimas, juntamente con impurezas proteínicas que los acompañan, caracterizado por que la solución que contiene proteasa se ajusta a pH 5,5 y se pone en contacto con una carboximetilcelulosa intercambiadora de cationes, ajustada al mismo pH, y por que la carboximetilcelulosa, juntamente con la proteasa I adsorbida sobre ella, se separa seguidamente de la solución, la cual se ajusta, a continuación, a un pH 4,5 y se pone en contacto con una carboximetilcelulosa ajustada a pH idéntico, después de lo cual se separa de la solución el material de celulosa juntamente con la proteasa II adsorbida sobre él, cuya solución se ajusta finalmente a pH III, para el aislamiento de la proteasa III, y se pone en contacto con una carboximetilcelulosa, cuyo pH es justamente el mismo que el de la solución, y por que la carboximetilcelulosa, juntamen-

282234

12 FEB



te con la proteasa III adsorbida sobre ella, se separa de la solución, eluyéndose después separadamente las proteasas I, II y III puras desde el intercambiador de cationes, mediante lavado con soluciones tampón, cuyos pH son superiores a aquéllós en los cuales fueron adsorbidas las respectivas proteasas.

8. Un procedimiento para una separación y aislamiento selectivos de la proteasa I, proteasa II y proteasa III desde soluciones que contienen estas enzimas juntamente con impurezas proteínicas que las acompañan, en el cual la solución obtenida a partir de un medio de cultivo filtrado, que se obtiene de un cultivo sumergido de *Aspergillus oryzae* hasta que se inicia la formación de esporas, se prepurifica mediante precipitación de las proteínas, incluyendo las proteasas, por medio de tanino, se separa el tanino con acetona, se redisuelve el residuo insoluble en acetona y se ajusta a pH 5,5, en cuyo procedimiento la solución que contiene proteasa se pone en contacto, seguidamente, con un polisacárido carboxilado intercambiador de iones, preferiblemente carboximetilcelulosa o carboximetildextrano, se ajusta a pH igual, y se separa de la solución el derivado de polisacárido juntamente con la proteasa I adsorbida sobre él, cuya solución se ajusta, seguidamente, a un pH 4,5 y se pone en contacto con un polisacárido carboxilado intercambiador de iones, preferiblemente carboximetilcelulosa o carboximetildextrano, se ajusta a un pH igual, y después se separa de la solución el intercambiador de iones juntamente con la proteasa II adsorbida, cuya solución se ajusta finalmente a pH 3,0 para el aislamiento de la proteasa III, y se pone en contac

282234



to con un polisacárido carboxilado intercambiador de iones, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en carboximetilcelulosa y carboximetildextrano, ajustado a pH igual y se separa de la solución el derivado polisacárido juntamente con la proteasa III adsorbida, eluyéndose después separadamente las proteasas I, II y III purificadas desde los respectivos intercambiadores de cationes, mediante un lavado con soluciones tampón, cuyos pH son superiores a aquéllos en los que fueron adsorbidas las respectivas proteasas.

9. Procedimiento de acuerdo con el punto 8, caracterizado por que la adsorción se realiza sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa.

10. Un procedimiento de acuerdo con el punto 8, caracterizado por que el pH de la solución se ajusta antes de la adsorción hasta el valor propuesto, mediante un tampón de fosfato 0,01 M.

11. Un procedimiento de acuerdo con el punto 8, caracterizado por que la elución se efectúa mediante un tampón de fosfato 0,05 M.

12. Un procedimiento para la purificación de proteasas seleccionadas del grupo que consiste en proteasa I, proteasa II y proteasa III, caracterizado por que se ajusta a pH 5,5 una solución que contiene por lo menos uno de estos enzimas juntamente con impurezas que lo acompañan, y se pone en contacto con una carboximetilcelulosa intercambiadora de cationes ajustada al mismo pH, y por que la carboximetilcelulosa juntamente con la proteasa I adsorbi



12F

282234

da sobre ella, se separa seguidamente de la solución,
que se ajusta a continuación a un pH 4,5 y se pone en con-
tacto con una carboximetilcelulosa ajustada a idéntico pH,
después de lo cual el material de celulosa juntamente con
5 la proteasa II adsorbida sobre él es separado de la solu-
ción, la cual es finalmente ajustada a pH 3,0 para el ais-
lamiento de la proteasa III, y puesta en contacto con una
carboximetilcelulosa cuyo pH es justamente el mismo que
el de la solución, y porque la carboximetilcelulosa junta-
10 mente con la proteasa III adsorbida sobre ella se separa
de la solución, después de lo cual las proteasas I, II y
III puras, son eluidas separadamente del intercambiador
de cationes mediante lavado con soluciones tampón, cuyos
pH son superiores a aquellos a los que fueron adsorbidas
15 las respectivas proteasas, y por que las proteasas I, II
y III así obtenidas, separadas una de la otra y de las im-
purezas de naturaleza proteínica presentes en la solución
de partida, se someten por separado a una purificación
posterior mediante cromatografía intercambiadora de iones
20 sobre un polisacárido intercambiador de iones que contie-
ne un grupo aniónico dietilaminoetilo, seleccionado del
grupo que consiste en dietilaminoetilcelulosa y dietilami-
noetildextrano.

13. Un procedimiento de acuerdo con el punto 12,
25 caracterizado por que las proteasas producidas en el cul-
tivo del *Aspergillus oryzae* y prepurificadas mediante pre-
cipitación con tanino, se aislan y se separan mediante ad-
sorción en etapas sobre una carboximetilcelulosa intercam-
biadora de cationes y por que los enzimas adsorbidos se
30 cromatografían, después de elución a pH 6,0 a 7,5, sobre

282234



una dietilaminoetilcelulosa intercambiadora de aniones.

5 14. Un procedimiento de acuerdo con el punto 13 para la purificación de proteasa I, caracterizado por que una solución de proteasa I, obtenida mediante elución de un adsorbato sobre carboximetilcelulosa, es cromatografiada sobre la dietilaminoetilcelulosa, utilizando un tampón de fosfato 0,01 M como disolvente de elución.

10 15. Un procedimiento de acuerdo con el punto 13 para la purificación de proteasa II, caracterizado por que una solución obtenida mediante elución desde un adsorbato sobre carboximetilcelulosa, se cromatografía a pH 6,0 sobre una dietilaminoetilcelulosa, utilizando un tampón de fosfato 0,10 M. como disolvente de elución.

15 16. Un procedimiento de acuerdo con el punto 13 para la purificación de proteasa III, caracterizado por que una solución de proteasa III, obtenida mediante elución desde un adsorbato sobre carboximetilcelulosa, se cromatografía a pH 6,0 sobre una dietilaminoetilcelulosa, utilizando un tampón de fosfato 0,50 M como disolvente de elución.

20 17. Un procedimiento de acuerdo con el punto 8, caracterizado por que los enzimas proteolíticos eluidos desde el adsorbato sobre carboximetilcelulosa, se aíslan mediante precipitación con tanino.

25 18. Un procedimiento de acuerdo con el punto 8, caracterizado por que los enzimas proteolíticos eluidos desde el adsorbato de carboximetilcelulosa, se aíslan mediante diálisis y secado por congelación.

30 19. Un procedimiento de acuerdo con el punto 13, caracterizado por que la cromatografía se realiza sobre

282234

12F



un intercambiador de aniones que posee una capacidad total intercambiadora de iones de 0,4 a 0,6 miliequivalentes por gramo de sustancia seca.

5 20. Un método para disolver coágulos de sangre
formados en las venas y arterias, caracterizado por que
se administra mediante inyección intravenosa una solución
en un medio inyectable, de por lo menos uno de los enzi-
mas seleccionados del grupo que consiste en proteasa I,
10 proteasa II y proteasa III preparados de acuerdo con cual-
quiera de los puntos 1 - 19, cuyas proteasas no atacan en
ningún grado apreciable, en las condiciones presentes en
el cuerpo, a otros componentes de la sangre y del plasma,
produciéndose estos enzimas mediante cultivo sumergido de
15 *Aspergillus oryzae* hasta la iniciación de la formación de
esporas, filtración de la solución de cultivo, prepurifi-
cación mediante una precipitación con tanino de las protea-
sas y otras proteínas presentes en el filtrado y formadas
en el cultivo, eliminándose dicho tanino con acetona, y
20 disolviéndose las proteínas restantes exentas de tanino
en una solución de tampón de fosfato ajustada a pH 5,5,
adsorción de proteasa I sobre una carboximetilcelulosa a-
justada al mismo pH, separación del adsorbato, ajuste del
pH de la solución remanente que contiene proteasa II y
25 proteasa III a 4,5, adsorción de la proteasa II sobre car-
boximetilcelulosa ajustada al mismo pH, separación del ad-
sorbato y ajuste del pH de la solución remanente que con-
tiene proteasa III a pH 3,0, adsorción de la proteasa III
sobre carboximetilcelulosa ajustada al mismo pH, separa-
30 ción del adsorbato, eluyéndose separadamente las protea-
sas I, II y III desde el adsorbato de carboximetilcelulo-

382234

12F



sa mediante lavado con soluciones tampón, cuyo pH es más elevado que aquél al cual fueron adsorbidas las respectivas proteasas, y aislamiento separado de las proteasas mediante diálisis y liofilización.

5 21. Un método para la disolución de coágulos de sangre, formados en las venas y arterias, caracterizado por la administración mediante inyección intravenosa de una solución en un medio inyectable de por lo menos uno de los enzimas, que son miembros del grupo que consiste en
10 proteasa I, proteasa II y proteasa III, preparados de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 - 19, que no atacan en ningún grado apreciable a otros componentes de la sangre y del plasma en las condiciones presentes en el cuerpo, y de cuyos enzimas la proteasa I está constituida por una
15 proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es parcialmente inhibida por el suero, pero no por los inhibidores de soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 4,5 a 9, que es activa dentro del intervalo de pH de 6,5 a
20 10,0 y que tiene su actividad máxima a un pH 8,0 y su temperatura óptima a + 47°C y es adsorbida a pH 5,5 sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M, y que puede ser eluida desde ésta a un pH 7,0 mediante un tampón de
25 fosfato 0,05 M, la proteasa II está constituida por una proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es parcialmente inhibida por el suero pero no por los inhibidores
30 de soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 4,0



12 FEB

282234

5 a 10,5, que es activa dentro del intervalo de pH de 3,5 a 11,0 y que tiene su actividad máxima a pH 6,3 y su temperatura óptima a + 50°C, y es adsorbida a pH 4,5 sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M, y que puede ser eluída desde ésta a un pH 7,0 mediante un tampón de fosfato 0,05 M, la proteasa III está constituida por una proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es inhibida por el suero y no por los inhibidores de soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 2,3 a 6,5, que es activa dentro del intervalo de pH de 2,0 a 11,0 y que tiene su actividad máxima a pH 5,0 y su temperatura óptima a + 42°C, y es adsorbida a pH 3,0 sobre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M, y que puede ser eluída de ésta a un pH 6,0 mediante un tampón de fosfato 0,05 M.

20 22. Un método para la aceleración de la curación de heridas purulentas y necróticas, caracterizado por la aplicación a las heridas de por lo menos un enzima proteolítico seleccionado del grupo que consiste en proteasa I, proteasa II y proteasa III, preparado de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 - 19, que actúa descomponiendo la sangre coagulada, los exudados y los tejidos necróticos, y que es completamente inactivo contra el tejido original y de cuyos enzimas la proteasa I está constituida por una proteína uniforme que es activa contra la fibrina, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es parcial-

25

30



12 FEB 1950

282234

mente inhibida por el suero pero no por los inhibidores de
soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 4,5 a
9, que es activa dentro del intervalo de pH desde 6,5 a
10,0, y que tiene su actividad máxima a un pH 8,0 y su
5 temperatura óptima a + 47°C, y es adsorbida a pH 5,5 so-
bre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 mi-
liequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de carbo-
ximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M y que
puede ser eluída de ésta a pH 7,0 mediante un tampón de
10 fosfato 0,05 M, la proteasa II está constituida por una
proteína uniforme, que es activa contra la fibrina, fibrí-
nógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es parcial-
mente inhibida por el suero pero no por los inhibidores de
soja, que es estable dentro del intervalo de pH de 4,0 a
15 10,5, que es activa dentro del intervalo de pH de 3,5 a
11,0, y que tiene su actividad máxima a un pH 6,3 y su
temperatura óptima a + 50°C, y es adsorbida a pH 4,5 so-
bre una carboximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9
miliequivalentes de grupos carboxílicos por gramo de car-
20 boximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M, y
puede ser eluída de ésta a un pH de 7,0 mediante un tam-
pón de fosfato 0,05 M, la proteasa III está constituida
por una proteína uniforme, que es activa contra la fibri-
na, fibrinógeno, caseína, gelatina y hemoglobina, que es
25 inhibida por el suero pero no por los inhibidores de soja,
que es estable dentro del intervalo de pH de 2,3 a 6,5,
que es activa dentro del intervalo de pH de 2,0 a 11,0 y
que tiene su actividad máxima a un pH 5,0 y su temperatu-
ra óptima a + 42°C, y es adsorbida a pH 3,0 sobre una car-
30 boximetilcelulosa que contiene de 0,7 a 0,9 miliequivalen



282234 12 FEB 1963

tes de grupos carboxílicos por gramo de carboximetilcelulosa desde un tampón de fosfato 0,01 M, y puede ser eluída de ésta a un pH 6,0 mediante un tampón de fosfato 0,05 M.

5 23. Un procedimiento para el aislamiento y separación selectivos de enzimas proteolíticos.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los cinco dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de cincuenta hojas escritas a máquina por una sola cara.

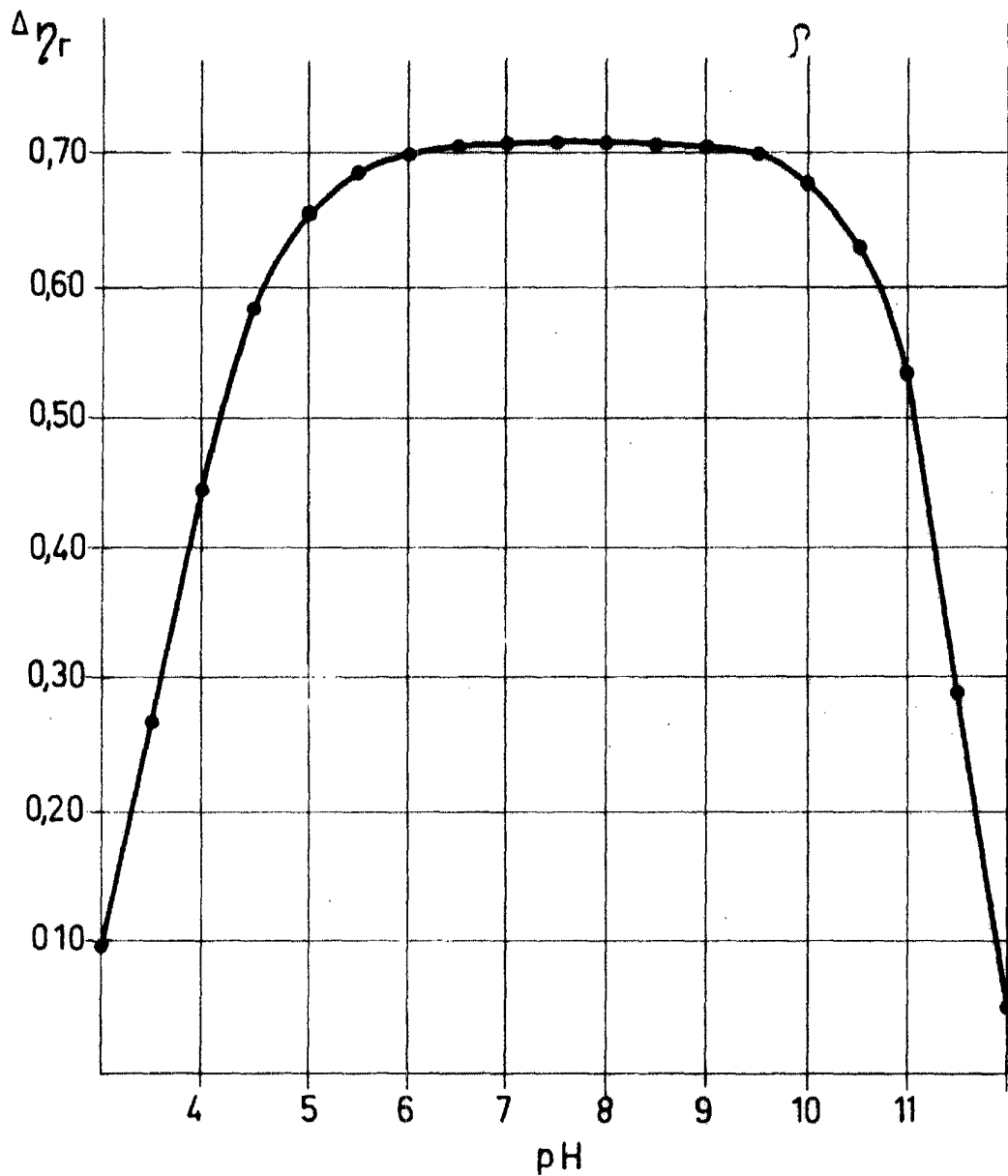
Madrid, 12 FEB. 1963

Asento de Elizabeth
Por Falso
Elizabeth

23015
-7 MAY 1952

282234

Fig. 1A

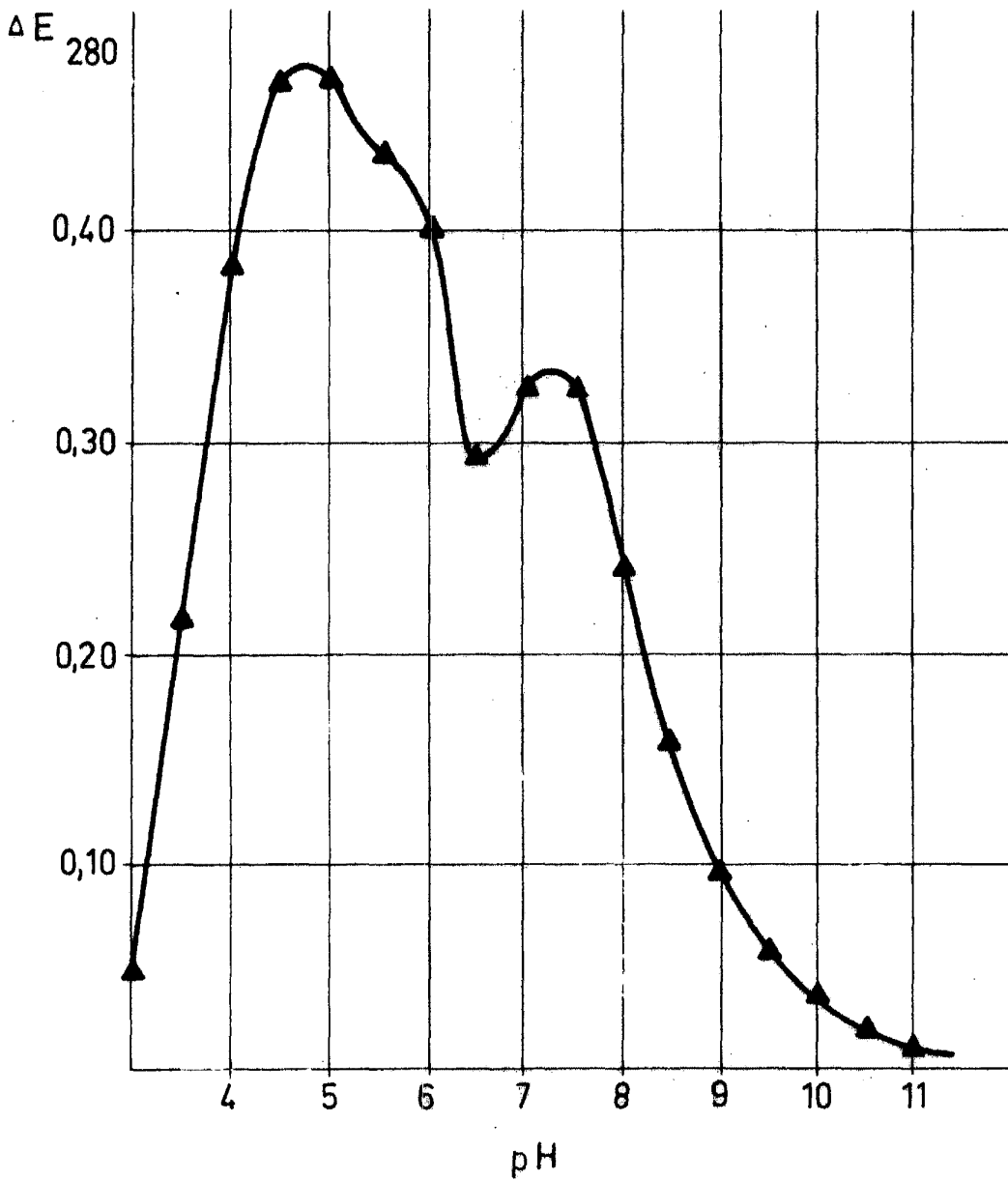


Alberto de Elizaburu
Dir. Factor



282234

Fig. 1B



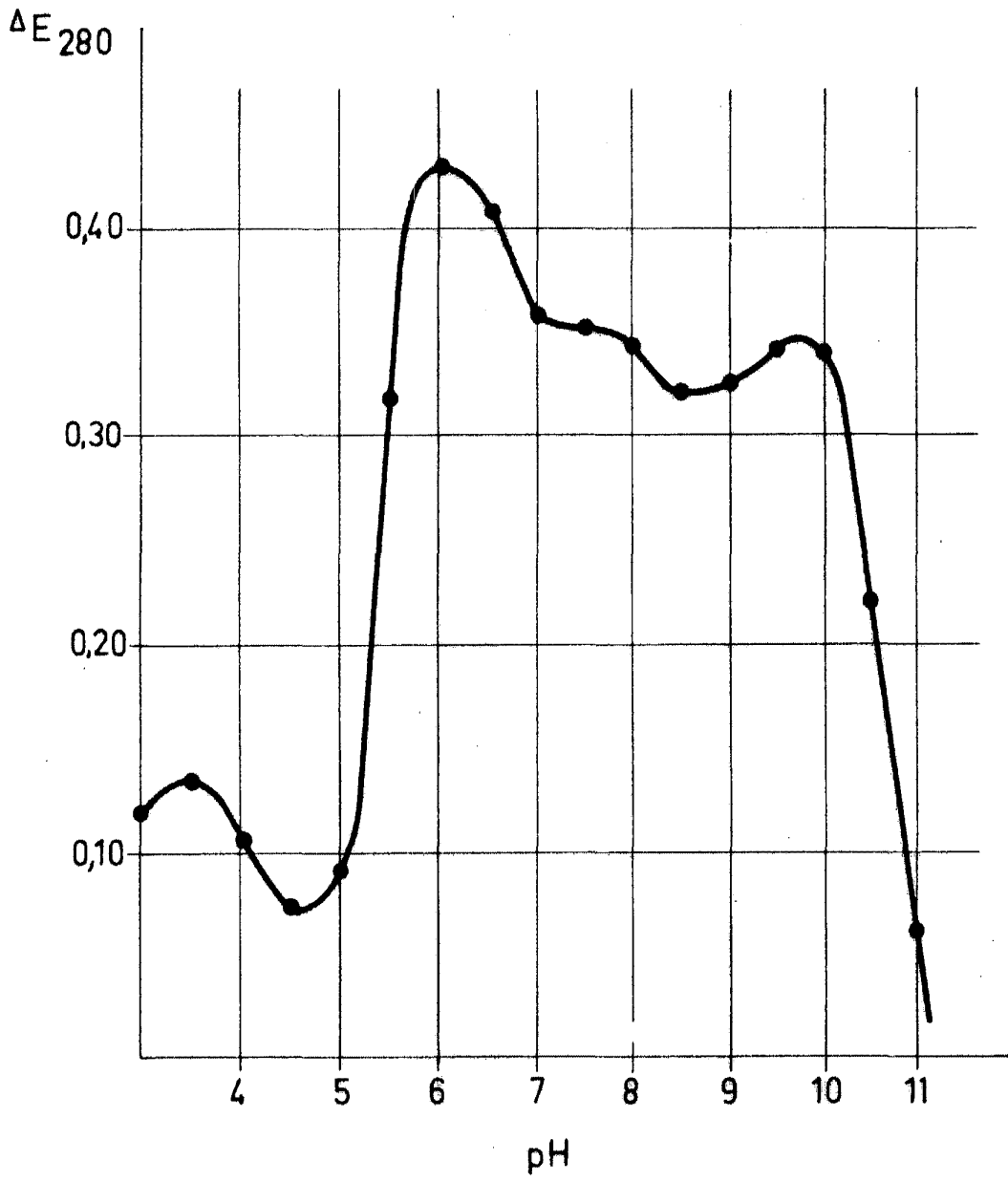
Alberto de Ezcurra
Fol. Poda.

282234

-7 NOV 1962

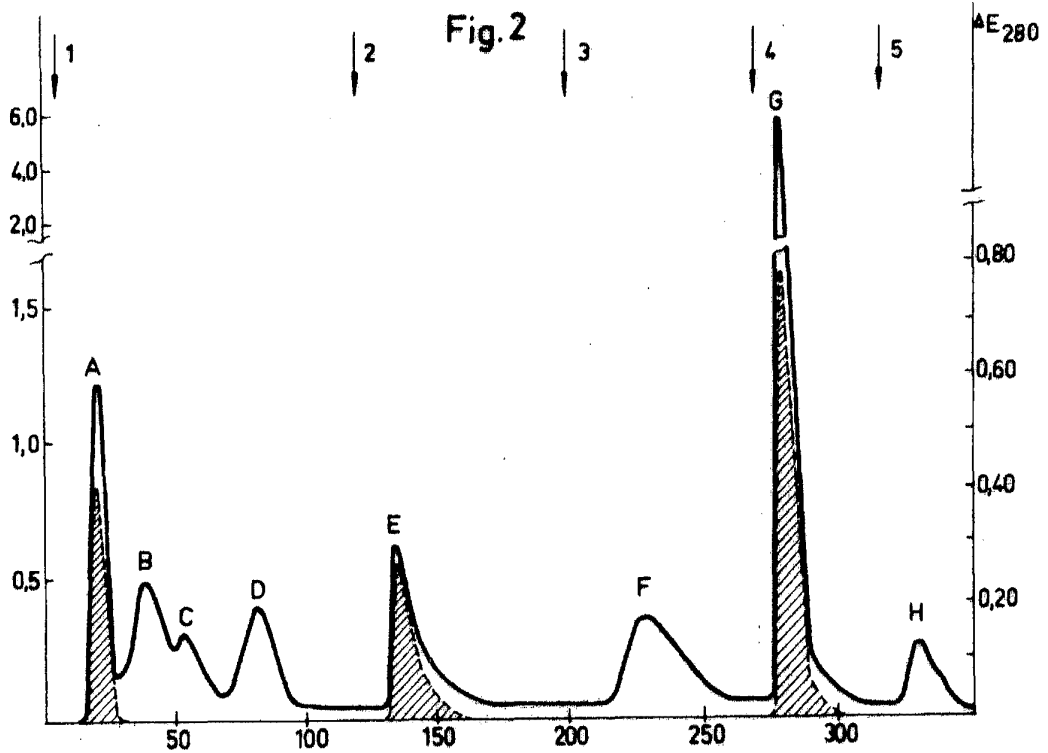


Fig. 1C



Alberto de Elzabuffi
Per. Elzabuffi

282234

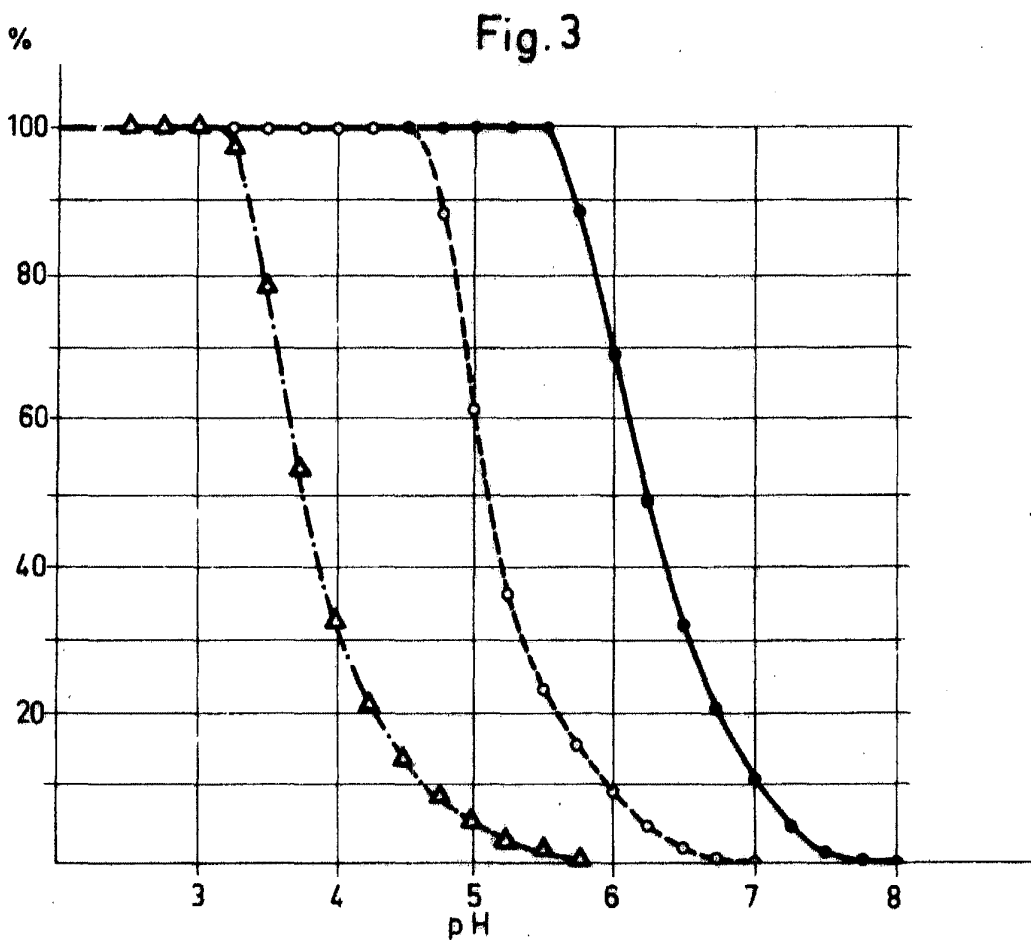


Alberto de Elizaburu
Per F. 100



282234

= 7 NOV



Alberto de Vizzani
Per [Signature]