

14 SEP. 1963

P.- 24.644

15/25/37/11

Protamine I/2

REHECHA I



**287913**

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

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

formulada el 11 de Mayo de 1963, con el Núm. 287.913

e n

E S P A Ñ A

por    VEINTE    años

a nombre de EVANS MEDICAL LIMITED, entidad británica, establecida en Speke Boulevard, Speke, Liverpool, Lancashire, Inglaterra, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES ACUOSAS"

---

Este invento se refiere a nuevas composiciones farmacéuticas que contienen protamina.

La protamina es un término genérico empleado para designar una clase de proteínas de bajo peso molecular que derivan principalmente de esperma y huevos de pescado. Su peso molecular está comprendido entre los límites de 2.000 y 8.000 habiéndose encontrado que posee una proporción extraordinariamente elevada de restos de arginina que, por tener un grupo guanidina libre, hacen que la proteína sea extraordinariamente básica. Así, por ejemplo, en la salmina derivada del sal-



món más de 80% de su contenido de nitrógeno está en forma de arginina, y la clupeína del arenque posee también un elevado porcentaje de arginina. Otras proteínas incluyen iridina, trutina, fontinina, lacrustrina, y esturina. Su existencia y propiedades están descritas en un trabajo de K. Felix (Advances in Protein Chemistry 1960, 15, 1-56). La base libre es un aceite que es escasamente soluble en agua, y sus sales, tales como el sulfato, son también escasamente solubles, aunque su solubilidad aumenta en presencia de ácido, p. ej. a pH 3,0. Tal como se aísla de esperma de pescado, la base protamina está generalmente en la forma de un aceite que contiene aproximadamente 50% de agua: se denomina normalmente "aceite de protamina".

La protamina posee propiedades anticoagulantes suaves, pero es principalmente valiosa como antídoto para el compuesto heparina, poderoso anticoagulante. Se administra generalmente cuando se ha dado una superdosis de heparina y se suele inyectar por vía intravenosa como solución al 12% acuosa. Debido a la difícil solubilidad de las sales de protamina, las soluciones de estas sales a pH neutro son inestables y tienden a precipitar. Como consecuencia, las soluciones de sulfato de protamina empleadas para inyección están a pH 3,0 (Injectio Protaminae Sulphatis B.P.C.). Como es natural, tales soluciones ácidas producen mucho dolor si se inyectan intramuscularmente o subcutáneamente estando limitada virtualmente la administración a la vía intravenosa.

Hemos encontrado ahora que pueden prepararse soluciones acuosas estables con actividad de protamina a pH muy por encima de 3,0, p. ej. aproximadamente 5,0, o incluso más, si hay presente en la solución un complejo formaldehído-bi-

287913



sulfito o sulfoxilato. A concentraciones relativamente bajas, p. ej. 5%, estas soluciones son estables (es decir, la protamina no tiene tendencia a separarse de la solución) incluso a pH neutro o alcalino, pero, a concentraciones mayores p.ej. 10-20%, el pH es preferiblemente de alrededor de 5,0. Sin embargo, la protamina no parece que dé lugar a la formación de compuesto con el complejo de formaldehído. Tales composiciones son mucho más convenientes para inyección que las soluciones ácidas que se empleaban anteriormente.

También hemos encontrado que pueden obtenerse soluciones conteniendo protamina aún más estables, si se calientan a pH alcalino las soluciones de protamina formaldehído bisulfito o sulfoxilato a que se ha aludido arriba. Las soluciones resultantes son estables a pH neutro o incluso alcalino, así como a pH ácido, incluso a concentraciones de protamina que suben hasta 20% y, calentando, p.ej. hasta unos 37°C., pueden obtenerse concentraciones del orden de 40%.

Aunque no queremos limitarnos por consideraciones de orden teórico, se cree que el complejo formaldehídico reacciona con los grupos amino libres presentes en los grupos guanidina formando derivados N-metilen-sulfito o derivados N-metilen-sulfoxilato.

Los productos conteniendo protamina obtenidos por la operación de calentamiento descrita arriba poseen propiedades que varían ligeramente de acuerdo con el grado en que se haya hecho reaccionar el complejo formaldehídico con los grupos amino libres. En general, son muchos menos tóxicos que las protaminas o sus sales, habiendo indicado los experimentos con ratones una DL<sub>50</sub> del orden de 2 gr. Kg de peso corporal. Poseen poca de la actividad de las protaminas in



vitro, pero parece que, in vivo, regeneran la proteína libre, puesto que su actividad es del mismo valor. Sin embargo, la velocidad de regeneración es lenta y las nuevas sustancias parece que sirven como preparados de reserva de protamina.

Así, pues, de acuerdo con el presente invento, proporcionamos soluciones acuosas inyectables de actividad protamínica de estabilidad mejorada que contienen protamina y/o una sal por adición de ácido, fisiológicamente aceptable, de la misma en unión o en combinación con un complejo de formaldehído-bisulfito y/o formaldehído-sulfoxilato.

Entre las sales de protamina figuran, por ejemplo; hidroháluro, fosfato, nitrato, citrato, tartrato y, más corrientemente, el sulfato.

Los bisulfitos y sulfoxilatos presentes en los complejos de formaldehído arriba citados incluyen, por ejemplo, bisulfitos de metal alcalino y sulfoxilatos, p.ej. las sales sódicas y potásicas. También pueden emplearse mezclas de bisulfito y sulfoxilato.

La concentración de protamina de las soluciones sencillas de acuerdo con el invento que contienen protamina no combinada puede pasar de 3% en peso y está limitada por la solubilidad hasta por debajo de 20%, aproximadamente. Las soluciones que contienen de 5 a 10% son de particular utilidad cuando hay que inyectar grandes dosis de protamina. La relación de complejo formaldehídico a protamina en tales soluciones simples conviene que esté situada por encima de 1:1, preferiblemente 3:2 o más, tendiendo las relaciones menores a producir estabilización incompleta mientras que las relaciones sustancialmente mayores exigen una concentración in-

287913



necesariamente alta del complejo formaldehídico. Para una solución al 10% de protamina, conviene que haya por lo menos 15% aproximadamente del complejo formaldehídico. En esta Memoria descriptiva, las concentraciones y las cantidades de protamina se dan en términos de la cantidad equivalente de base protamina, esté o no la protamina en forma de sal o en combinación con el complejo formaldehídico.

Las soluciones sencillas a concentración alta, tal como se ha indicado arriba, están preferiblemente a pH 5,0, aproximadamente, y, en general, el pH de la solución está comprendido entre 5,0 y 8,0. Si se desea, puede haber presentes sales fisiológicamente aceptables, tal como cloruro sódico, etc.

En las soluciones de acuerdo con el invento que contienen la protamina y el complejo formaldehídico en forma combinada. La relación de complejo formaldehídico a protamina puede ser tan baja como 1:1,5, pero es preferiblemente mayor, por ejemplo, 1:1,25.

De acuerdo con otra característica del invento, proporcionamos composiciones para disolución en agua con el fin de obtener soluciones estables con actividad protamínica, que contienen protamina y/o una sal fisiológicamente aceptable de la misma en unión o en combinación con un complejo de formaldehido-bisulfito y/o formaldehido sulfoxilato. En dichas composiciones, la relación de complejo a protamina debe estar preferiblemente, como es natural, comprendida dentro de los límites especificados arriba. El compuesto formado entre protamina y el complejo puede aislarse en forma sólida de las soluciones arriba descritas, p. ej. por precipitación, y constituye otra característica adicional del invento. Antes de ahora no se había descrito en la bibliografía una sustancia de esta naturaleza,



y su toxicidad mucho más reducida y la ausencia de actividad in vitro ponen claramente de manifiesto que se forma un compuesto verdadero, aunque, como la proteína originaria es en sí misma de composición variable, la nueva sustancia no está bien caracterizada desde el punto de vista físico.

Las soluciones de acuerdo con el invento pueden prepararse por un procedimiento, que constituye otra característica más del invento, en el que se disuelven en agua protamina y/o una sal por adición de ácido, fisiológicamente aceptable, de la misma y un complejo formaldehído-bisulfito o formaldehído sulfoxilato, para formar, directamente o por calentamiento a pH alcalino, una solución con actividad protamínica de estabilidad mejorada. Las relaciones de los componentes son preferiblemente las señaladas arriba.

Cuando se calientan las soluciones para formar el compuesto citado entre la protamina y el complejo formaldehídico, conviene que la temperatura de reacción esté por encima de 40°C., preferiblemente entre 90-100°C. Se prefiere que el pH sea superior a 9,5, y mejor todavía por encima de 10,5, aunque, a pH mayor de 13, puede ocurrir alguna destrucción del material y por ello se prefieren valores de pH por debajo de 12. El tiempo de reacción está comprendido preferiblemente entre 1 y 20 horas y se ha encontrado que, para conseguir resultados óptimos, varía con el pH y la relación de complejo formaldehído a protamina. En general, cuanto mayor es el pH o la relación anterior, menor es el tiempo de reacción que se necesita para llegar a buenos resultados.

Las propiedades del producto de reacción varían ligeramente con la amplitud con que ha tenido lugar la reacción, es decir, según la amplitud con que los grupos conteniendo

287913



azufre se han incorporado en la molécula; en general, el incremento en la relación de complejo formaldehídico a protamina, el tiempo de reacción y la temperatura y el pH tienden todos a incrementar el contenido de azufre del producto final y, por tanto, la estabilidad de las soluciones inyectables resultantes.

La solución resultante puede prepararse para inyección por esterilización, p. ej. por filtración para eliminar bacterias, etc. o por tratamiento térmico, p. ej. en un autoclave. El pH puede ajustarse p. ej. dentro de límites de 5-8, por adición de ácido, p.ej. ácido mineral como ácido clorhídrico, sulfúrico, etc.

El compuesto en cuestión puede extraerse de las soluciones acuosas, por ejemplo por precipitación, p. ej. añadiendo un disolvente orgánico miscible con agua, tal como un alcohol, p.ej. etanol.

Para que pueda comprenderse mejor el invento se dan los siguientes ejemplos únicamente con carácter ilustrativo:

#### Ejemplo 1

Se disolvieron 500 gramos de sulfato de protamina comercial procedente de salmón, en 5 litros de solución salina normal. Después de ajustar su pH a 10,0 con sosa caústica, se calentó la solución a 70°C; se separó por filtración un precipitado pardo formado. El filtrado se trató con ácido clorhídrico diluido hasta que su reacción era de pH 7,6 y luego se filtró de nuevo. Después de dejar en reposo a una temperatura de 4°C durante 4-5 días, se separó un aceite. El líquido que sobrenada se decantó y se tiró. El aceite residual



constituido por base protamina se lavó con solución salina  
enfriada con hielo, se dejó otra vez que se separase por re-  
poso en frío y se recogió. Se repitió esta serie de opera-  
ciones. Se completaron hasta volumen de 250 ml. con solución  
5 acuosa al 15% de formaldehído bisulfito sódico, 50 gramos de  
la base protamina así obtenida, que contenía algo de agua  
asociada. Se ajustó la solución a pH 5,0 mediante adición  
de suficiente ácido clorhídrico diluído. La solución era com-  
pletamente estable a temperaturas ordinarias y se filtró a  
10 través de un filtro bacteriológico introduciéndose en empollas.  
De este modo se obtuvo una solución que contenía N total =  
2,26% (peso:volumen), lo cual corresponde a una solución al  
10% de sulfato de protamina. No era pirogénica en conejos a  
dosis de 20 mgr. de protamina/kg. de peso corporal, y su to-  
15 xicidad, al darse por vía intravenosa a ratones, correspon-  
día a una  $DE_{50}$  de 54 mgr. de protamina/kg. de peso corporal.  
Se encontró que el producto neutralizaba la actividad anticoa-  
gulante de heparina in vitro empleando plasma de oveja y, en  
este aspecto, su actividad resultó igual, haciendo la compa-  
20 ración en peso, al sulfato de protamina comercial. Además,  
neutraliza el efecto de la heparina sobre el tiempo de coagula-  
ción de sangre de ratones, y para este fin, puede administrar-  
se por vía intramuscular mostrando por tanto al mismo tiempo  
que la absorción de protamina tiene lugar cuando se da en es-  
25 ta forma.

#### Ejemplo 2

Se disolvieron 5 gramos del aceite protamínico obte-  
nido a partir de sulfato de protamina comercial como en el  
30 Ejemplo 1, en suficiente solución acuosa de formaldehído



sulfoxilato sódico al 20% (peso:volumen) para dar un volumen final de 25 ml. La solución así obtenida después de ajustar el pH a 5 por adición de unas pocas gotas de ácido clorhídrico diluido permaneció estable a temperatura ambiente.

5

### Ejemplo 3

Se calentaron 500 gramos de aceite protamínico procedente de esperma de salmón (salmina) con una solución de 200 gramos de formaldehído bisulfito sódico en 500 ml. de agua sobre un baño de agua hirviente durante 16 horas después de ajustar el pH de la mezcla a 10,5 con sosa caústica. Después de enfriar se neutralizó la solución hasta pH 7,4 mediante adición de ácido clorhídrico diluido, se completó hasta un volumen de 2500 ml. con agua destilada, se clarificó por filtración y se esterilizó, después de introducir en envases adecuados, tratando en autoclave a una presión de vapor de 0,70 Kg./cm<sup>2</sup>. durante 30 minutos. El análisis acusó un contenido de nitrógeno de 2,2%, que corresponde a una solución de protamina al 10%. Las muestras dieron resultado satisfactorio en el ensayo de no pirogenicidad en conejos a una dosis equivalente a 20 mgr. de protamina por kg. de peso corporal, y, en ensayos sobre ratones, se encontró que la DL<sub>50</sub> era aproximadamente de 2000 mgr. protamina/kg. de peso corporal.

Se trató la solución final con 2 partes en volumen de etanol para precipitar una goma que, después de separación y trituración con nueva cantidad de etanol, dió un producto sólido. Se filtró éste, se lavó con etanol y se secó en vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dando un producto sólido que contenía N,16,8% y S,10,8%.

287913



Ejemplo 4

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1 con relaciones crecientes de complejo formaldehído a protamina. En la tabla que se da a continuación figuran los análisis de N y S del producto resultante. En todos los casos se calentaron 5 gr. de aceite protamínico durante 2 horas con 25 ml. de agua que contenía la cantidad requerida de formaldehído bisulfito sódico.

10

<u>Aceite protamínico</u>	<u>Formaldehído bisulfito sódico</u>	<u>N %</u>	<u>S %</u>
5 g	3 g	13,8%	11,8%
5 g	4 g	12,6%	12,5%
5 g	5 g	10,7%	13,8%

15

Ejemplo 5

Se calentaron 5 gramos de aceite protamínico procedente de esperma de salmón durante dos horas con una solución preparada a partir de 2 gr. de formaldehído sulfoxilato sódico en 20 ml. de agua, y cuya reacción se había ajustado a pH 11,0. Después de enfriar, se ajustó la solución a pH 7,4 por medio de ácido clorhídrico diluido, se completó hasta volumen de 25 ml. y se filtró la solución. El producto se obtuvo así como solución estable.

20

25

Ejemplo 6

Se disolvieron 500 gramos de sulfato de clupeína en 4.500 mililitros de solución salina fisiológica. Se ajustó la solución a pH 10,7 con sosa cáustica, y después de ele-

30



var la temperatura a 70°C se filtró el líquido en caliente para eliminar un precipitado pardo. Se ajustó luego la reacción del filtrado a pH 7,6 por medio de ácido clorhídrico diluido. Por reposo a 4°C durante 3 días, se separó un aceite. Después de separar el líquido sobrenadante por decantación, se agitó el aceite con 4,5 litros de solución de cloruro sódico al 1,8% y luego se dejó sedimentar por conservación a 4°C. Se disolvieron 50 gramos del aceite así obtenido (N = 12,2%) en solución acuosa de formaldehído bisulfito sódico al 15% para dar un volumen final de 250 mililitros. Se ajustó la reacción de la solución a pH 5,0 con ácido clorhídrico diluido. La solución (N= 2,10%) se introdujo asépticamente en ampollar (5 ml.) cada una de las cuales contenía 500 ml. de base protamina, y tenía propiedades biológicas sustancialmente iguales a las del producto obtenido en el Ejemplo 1 anterior.

#### Ejemplo 7

Se disolvieron 1000 gramos de base cupleína acuosa (N= 13,3%) en 4 litros de agua que contenían 400 gramos de formaldehído bisulfito sódico. Se ajustó el pH de la solución a 10,15 con sosa cáustica y luego se calentó durante 18 horas a 70°C. Después de enfriar, se rebajó la reacción del líquido a pH 7,35 por medio de ácido clorhídrico diluido, y se completó el volumen hasta 4560 mililitros con agua destilada. Después de filtración estéril, se introdujo la solución en ampollas. Se calentaron estas luego durante 30 minutos a una presión de vapor de 0,70 Kg/cm<sup>2</sup>. El análisis del producto acusó un contenido de N de 2,6%. En ensayos de toxicidad sobre ratones, se encontró que su DL<sub>50</sub> era del orden



de 1500 mgr./kg. de peso corporal expresándose la dosificación como protamina. En ensayos de no pirogenicidad sobre conejos, esta sustancia dio resultado satisfactorio a un nivel de dosis que correspondía a 20 mgr. protamina kg. de peso corporal.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 22 de Mayo de 1962, bajo los números 19.701/62 y 19.702/62, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- 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:

1º.- Un procedimiento para la preparación de soluciones acuosas inyectables protaminoactivas de estabilidad perfeccionada, en el cual se disuelven en agua protamina y/o una sal de adición de ácido, fisiológicamente aceptable, de la misma, y un complejo de formaldehído-bisulfito y/o formaldehído-sulfoxilato, para formar, bien directamente o bien por caldeo a un pH alcalino, una solución protaminoactiva de estabilidad perfeccionada.

2º.- El procedimiento del punto 1, en el cual el bisulfito o el sulfoxilato de dicho complejo es un bisulfito o un sulfoxilato de metal alcalino.

3º.- El procedimiento del punto 1 o 2, en el cual



el pH de las soluciones sin calentar está comprendido entre 5 y 8.

4º.- El procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 3, en el cual la relación de dicho complejo de formaldehído a la protamina está comprendido entre 1:1 y 2:1, en peso.

5º.- El procedimiento del punto 4, en el cual la relación es de al menos 3:2, en peso.

6º.- El procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 5, en el cual la concentración de protamina en la solución está comprendida entre 0,5 y 20% en peso.

7º.- El procedimiento del punto 1, en el cual, cuando la solución se calienta a un pH alcalino, este pH es de al menos 9,5.

8º.- El procedimiento del punto 7, en el cual el pH es de al menos 10,5.

9º.- El procedimiento del punto 7 u 8, en el cual el pH es inferior a 13.

10º.- El procedimiento del punto 9, en el cual el pH es inferior a 12.

11º.- El procedimiento de cualquiera de los puntos 1, y 7 a 10, en el cual la temperatura a la que se calienta la solución es superior a 40°C.

12º.- El procedimiento del punto 11, en el cual la solución se calienta a 90-100°C.

13º.- El procedimiento de cualquiera de los puntos 1 y 7 a 12, en el cual la relación del complejo de formaldehído a la protamina es de al menos 2:3.

14º.- El procedimiento del punto 13, en el cual dicha relación es de aproximadamente 1:1,25.

287913



15º.- El procedimiento de cualquiera de los puntos 1 y 7 a 14, en el cual el compuesto formado entre la protamina y el complejo de formaldehído se recupera a continuación en forma sólida.

5 16º.- El procedimiento del punto 15, en el cual dicho compuesto se precipita de la solución acuosa añadiendo un disolvente orgánico miscible en el agua.

17º.- El procedimiento del punto 16, en el cual el disolvente orgánico miscible en el agua es un alcohol.

10 18º.- Un procedimiento para la preparación de soluciones acuosas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

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

Madrid,

14 SEP. 1963

P.A.

Alfredo de Elizaburu  
Cof. P.A.

287913