

325401

PATENTE DE INVENCION
Le A 9377-Sp.



325401

Memoria Descriptiva

sobre

"PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN INHIBIDOR TIPO PEPTIDO
PARA TRIPSINA"

Solicitante: FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad
alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk, Alemania.

5. Este invento se refiere a un nuevo péptido inhibidor de la tripsina, el aislamiento y purificación de la misma partiendo de las glándulas pancreáticas de los mamíferos y a los preparados farmacéuticos que contienen el nuevo inhibidor como componente

325401

- 2 - 12



activo esencial.

5. Se sabe que las glándulas pancreáticas del ganado vobino contienen inhibidores para la tripsina. Así, por ejemplo, el Kazal aislado del páncreas del ganado vobino, un inhibidor para la tripsina y trombina (Rf. L.A. Kazal, D.S. Spicer y R.A. Brahinsky, J. American Chemistry Society 70, 3034 (1948)). También se sabe que se puede aislar un inhibidor de los órganos del ganado bovino, como son las glándulas parótidas,
10. hígado, pulmones, bazo, glándulas linfáticas y páncreas, que inhibe no solamente la tripsina sino también la quinotripsina, calicreina y plasmina (Patente Alemana N° 1.084.433). Se ha averiguado que este inhibidor es idéntico al inhibidor de M. Kunitz y H. Northorp, J. General Physiology 19, 991 (1936).
- 15.

20. Actualmente se ha descubierto que se puede aislar de las glándulas pancreáticas de los mamíferos, lo cual era antes desconocido, un inhibidor tipo polipéptido para la tripsina que no inhibe la quinotripsina, calicreina, trombina y plasmina.

25. Las glándulas pancreáticas de los mamíferos son materiales de partida apropiados para el aislamiento del nuevo inhibidor. Son en especial apropiadas las glándulas pancreáticas de los cerdos, pero también son apropiadas las glándulas de perros, vacas, ovejas y caballos.

30. El nuevo inhibidor puede aislarse partiendo de los materiales anteriormente citados mediante cualquiera de los métodos conocidos. Es un procedimiento rápido homogeneizar las glándulas pancreáticas con

325401



- 3 -

5. un compuesto desproteinizante a temperaturas elevadas y separar la solución que contiene el inhibidor. El inhibidor puede ser adsorbido por cambiadores de cationes directamente de la solución, previa desalinización si fuera necesario, y purificarse después mediante decantación fraccionada. La elución se efectúa con soluciones alcalinas o con una solución de sal neutra.
10. Son cambiadores de catión apropiados, por ejemplo, la carboximetilcelulosa, sulfoetilcelulosa, fosforilcelulosa y las resinas permutadoras de cationes.
- El nuevo inhibidor se obtiene así con un alto grado de pureza y buen rendimiento.
15. El inhibidor del invento muestra diversas fracciones activas acusadas por electroforesis de zona. La estimación del peso molecular por filtración de la gel según el método de P. Andrews (Biochem. I. 91, (1964), 222) muestra valores comprendidos entre 6800 y 7600.
20. En nuevo inhibidor del invento es un polvo blanco que tiene un punto de descomposición por encima de los 210°C, ligeramente soluble en agua y soluciones salinas.
- En las Figuras 1 y 2 aparece el espectro IR y UV, respectivamente.
25. Comportamiento de Inhibición contra Enzimas
30. Actividad específica: 3,0 ImU/ μ g proteína, donde 1 ImU reduce la transformación catalizada de la tripsina de 2 μ mol de sustrato (N-beonzoil-DL-arginina-p-nitroanilido) por minuto a 25°C, a 1 μ mol. Aún más, se inhibe la papaina enzimática vegetal.

325401



- 4 -

5. No se inhiben: quimotripsina (esterolisis y proteolisis), calicreina (esterolisis y descenso en la presión sanguínea del perro, trombina (esterolisis y coagulación del total de la sangre o plasma) y plasmina (esterolisis y proteolisis).

10. El nuevo inhibidor forma con la tripsina un complejo que puede emplearse para conseguir una buena purificación del inhibidor. Con este fin, se fracciona el complejo a un pH ácido después de una previa separación de los materiales que contiene pero que no forman un complejo con la tripsina. Ambos componentes pueden recuperarse con buenos rendimientos partiendo de la mezcla resultante de la fraccionación.

15. El nuevo inhibidor tiene gran utilidad en preparados farmacéuticos, v.g., para inhibir la tripsina y otras enzimas y, con este fin, se prepara en una solución acuosa u otro tipo de solución para ser administrado, por ejemplo, por vía inyectable, en la que el inhibidor esté presente en una cantidad eficazmente terapéutica en el vehículo inerte o cualquier otro vehículo que constituya la mayor parte del preparado.

20.

El invento se ilustra mediante el siguiente ejemplo que no supone limitación alguna del mismo.

E J E M P L O

25. Se homogeneizan 10 kilogramos de glándulas pancreáticas de cerdo con 10 litros de ácido perclórico al 6% y se calienta a 60°C empleando poco tiempo. Después de dejarla enfriar, se centrifuga la mezcla de los compuestos no disueltos y se neutraliza el sobrenadante claro con una solución de K_2CO_3 al 2,5%. Esta solu-
- 30.

325401



ción puede inactivar un total de 1,5 gramos de tripsina, correspondiente al contenido de 3 millones de unidades de inactivador de tripsina (TIU). (1 TIU inhibe el 50% de 1 γ tripsina).

5. El $KClO_4$ precipitado se filtra y se concentra vigorosamente el filtrado en un evaporador de rotación de vacío. Se decanta de las sales precipitadas. Se quita la sal del concentrado en partes de 70 ml a través de una columna Sephadex-G-25 (5 x 200 cm).
- 10.
15. Las fracciones combinadas de inhibidor se llevan a una columna de carboximetilcelulosa equilibrada con M/100 de regulador de acetato amónico (pH 6) y se separan los péptidos aniónicos con el mismo regulador tirándose después. Los péptidos catiónicos se obtienen entonces mediante elución gradiente (200 ml M/100 de regulador de acetato amónico de pH 6 y una solución de NaCl al 2,5%).
20. Se liofiliza la fracción que contiene al inhibidor y se somete de nuevo a las mismas operaciones de purificación. De esta forma, se consigue 800 veces la purificación del inhibidor. La pureza del inhibidor es ahora de 0,22 μg /(TIU). El rendimiento alcanza un 54%.
25. Para obtenerse una purificación adicional se añade una solución de tripsina concentrada en 0,1M de amortiguador con un pH de 7,8 a la anterior solución del inhibidor de modo que todavía quede suelta una pequeña cantidad del inhibidor.
30. Entonces se fracciona el complejo inhibidor de tripsina en una columna Sephadex-G-50. El

325401

- 6 -



5. contenido de inhibidor de las fracciones se estima mediante desproteínización y cálculo o valoración del efecto de inhibición de la tripsina en el filtrado. Después de la liofilización el complejo del inhibidor eluido se fracciona en una tripsina y se equilibra una fracción de inhibidor en una columna Sephadex-G-50 equilibrada con HCl de 0,01 N. El inhibidor puro se obtiene mediante liofilización y deslinación en Sephadex-G-25. Se puede volver a emplear la tripsina.

10. La pureza de este preparado es de 0,15 μ g/TIU.

15. Se consiguen aproximadamente los mismos resultados con glándulas pancreáticas de perros y se pueden emplear otras especies como material de partida.

N O T A

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente presentada en Alemania, con fecha 12 de Abril de 1.966 n^o F 45.794 IVa/30h, acogiendo

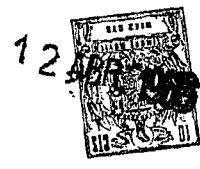
25. por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España, sobre: "Procedimiento para obtener un inhibidor tipo péptido para

30. tripsina", caracterizándose por lo siguiente:

3254017-



5. 1^a.- Procedimiento para obtener un inhibidor tipo péptido para tripsina, aislado de las glándulas pancreáticas de animales mamíferos y que no inhibe la quimotripsina, calicreina, trombina y plasmina, que tiene un peso molecular calculado entre 6800 y 7600 y se trata de un polvo blanco que tiene un punto de descomposición por encima de los 210°C, es soluble en agua y soluciones salinas, caracterizado porque comprende las operaciones de adsorber el inhibidor mediante un permutador de catión partiendo de una solución que contiene al inhibidor conseguida con glándulas pancreáticas de animales mamíferos y aislar el inhibidor del permutador de catión.
- 10.
15. 2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el permutador de catión se elige del grupo consistente en carboximetilcelulosa, sulfoetilcelulosa, fosforilcelulosa y resinas permutadoras de cationes.
20. 3^a.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las glándulas pancreáticas se homogeneizan con un compuesto desproteinizante a temperatura elevada y porque la adsorción se realiza sobre la solución que contiene al inhibidor después de su neutralización.
25. 4^a.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el inhibidor se hace complejo en una solución añadiendo tripsina y se recupera el inhibidor del complejo en forma purificada.
30. 5^a.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se fracciona el complejo a



325401 - 8 -

un pH ácido después de haber efectuado la separación de los materiales que acompañas pero no forman un complejo con tripsina antes de la recuperación del inhibidor purificado.

5. 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque las glándulas se homogeneizan con ácido perclórico y el sobrenadante claro que permanece después de la centrifugación se neutraliza con una solución de carbonato.

10. 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la filtración en gel de una solución que contiene al inhibidor producido partiendo de las glándulas pancreáticas de animales mamíferos y el aislamiento o separación del inhibidor de la solución.

15. 8ª.- "Procedimiento para obtener un inhibidor tipo péptido para tripsina", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

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

[Handwritten signature]

Madrid. 12 ABR. 1966

J. GOMEZ ACEBO Y MODEI
F. Firmado: F. Hernández Ruiz
FARBENFABRIKEN HAYER AKTIENGESELLSCHAFT