

337146



PATENTE DE INVENCION

Le A 9901-Sp.

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la preparación de
inactivador de calicreína cristalizado"

==.==.==.==.==.==

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

==.==.==.==.==.==

La presente invención se refiere a un nuevo inac
tivador de calicreína cristalino, sustancialmente puro, y
al método para obtener el material cristalino.

La calicreína es un producto fisiologicamente ac
5. tivo que produce simultáneamente un decrecimiento de la

- 2 -
337 14 6



presión sanguínea y un incremento de la circulación de la sangre en los pulmones, cerebro, piel y músculos. El mecanismo según el cual actúa la calicreína ha demostrado ser un proceso proteolítico.

5. El inactivador de calicreína (KI) es una sustancia distinta y diferente que inhibe tanto la actividad de la calicreína como también las de ciertas otras enzimas disociadoras de proteínas. La sustancia se encuentra en los órganos de los animales y en particular en el pulmón, las glándulas linfáticas y las glándulas parótidas así como en el páncreas, hígado, bazo y en la sangre. El inactivador de calicreína fué preparado por primera vez por H. Kraut, E. K. Frey y E. Werle mediante la extracción de ciertos órganos secos de mamíferos con agua o ácido acético diluido y precipitación del inactivador de estos extractos mediante la adición de etanol.
- 10.
- 15.

20. Ya se conocen métodos adicionales para la preparación de inactivador de calicreína que comprende el aislamiento del inactivador de los materiales de origen previamente indicados. Sobre este particular son de mencionar el método que fué revelado en la patente USA Nr, 2.890,986. Este procedimiento comprende la extracción de los órganos animales con ácido etanólico acuoso diluido, concentración del extracto en vacío, extracción del extracto concentrado para eliminar las impurezas de la fase acuosa, adición de un disolvente orgánico miscible con agua a la fase acuosa con objeto de precipitar el inactivador de calicreína, disolver el precipitado recuperado en ácido acético di-
- 25.
- 30.



337 146

5. luido, ajustar la solución obtenida a un pH de 7,5 a 8,5 y eliminación del mismo de las impurezas precipitadas. A continuación de ésta última etapa se vuelve a agregar un disolvente orgánico miscible con agua para precipitar el inactivador el cual se recupera entonces en forma de un polvo seco.

10. Procesos adicionales para la preparación de soluciones relativamente puras de inactivador de calicreina se revelan en la patente USA Nr. 3,181.997. Con respecto a éstos métodos conocidos para la preparación del inactivador de calicreina también se ha de mencionar el procedimiento para la preparación de KI relativamente puro mediante el uso del ácido metafosfórico o sus sales acuosolubles para formar un precipitado escasamente soluble que es seguido de un tratamiento del precipitado para obtener la substancia de inactivador fácilmente soluble en agua, que tiene un nivel de pureza de aproximadamente 0,16 a 0,19 μ g/U de KI.

15. El material inactivador de calicreina presente en la solución, que se obtiene mediante los procedimientos previamente conocidos, se clasificó como un polipéptido con un peso molecular de 11.000 a 12.000. Se creyó que contenía 16 aminoácidos distintos y que tenía como radical amidoácido N-terminal a la arginina y como radical C-terminal la alanina. Estas soluciones se señalaron como no estables contra el alcalí, Se indicó que a temperaturas bajas eran estables durante pocas horas hasta un pH aproximadamente 9.

20. Recientemente se ha descubierto que el inactivador de calicreina puro es un polipéptido que tiene

25.

30.



337 146

5. un peso molecular aproximado de 6.500. Contiene 16 aminoácidos distintos en cadena consistentes en conjunto de 58 residuos aminoácidos. La secuencia aminoácida es idéntica a la del inhibidor de tripsina del pancreas de Kunitz y Northrop. Véase Kunitz, M., y Northrop, J.H., J. Gen, Physiol., 19,991 (1936). Estos dos polipéptidos son la misma substancia y se conocen por el nombre antiguo de inactivador de calicreína. El inactivador de calicreína es una substancia fuertemente básica.

10. Hasta la fecha de la presente invención, ni el inactivador de calicreína ni el inhibidor de Kunitz han sido obtenidos como tales en forma puramente cristalizada. Con anterioridad a la presente invención se conocía el separar de soluciones que contenían los mismos, a un pH que indicaba un valor de baja acidez, el inactivador de calicreína y el inhibidor de Kunitz mediante sulfato de magnesio o de amonio. Véase F. Schulz, H. Kraut, y N. Bhargava "Naturwissenschaften" 50 paginas 375, 1963. Los materiales cristalinos que se obtienen mediante el proceso con sulfato de magnesio o amonio son prismas de seis lados que contienen aproximadamente un 50% de sulfato de magnesio o de amonio. Estos materiales cristalinos obtenidos previamente son por
15. lo tanto sales de los polipéptidos básicos libre. Si se desea obtener la substancia pura entonces se deben de liberar primeramente las sales y esto se puede lograr solo despúes de la disolución de los cristales.

20. Se ha descubierto ahora que el nuevo inacti-
25. vador de calicreína cristalino esencialmente puro, y
- 30.



- que este sustancialmente libre de material amorfo y de sales inorgánicas, se puede obtener mediante cristalización de la solución básica de acuerdo con el proceso de la presente invención. Los resultados de la presente invención eran imprevisibles en vista del hecho de que no se conoce ningún ejemplo por la literatura según el cual ningún polipéptido que tenga un peso molecular tan elevado como el inactivador de calicreina esto es 6.500, se pudiera obtener en forma cristalina simplemente mediante un cambio en el valor del pH y sin la adición de sales. Es así mismo sorprendente que el inactivador de calicreina por sí se mantenga estable a un pH superior a 9. Repetidamente se ha indicado en la literatura que el inactivador de calicreina es inestable en un medio alcalino. Por lo tanto en la literatura se ha recomendado el neutralizar las soluciones de inactivador ya que son susceptibles a los efectos del pH.
- El proceso de la presente invención, según el cual se prepara el nuevo KI cristalino, comprende como paso inicial el preparar una solución acuosa de los materiales de inactivador de calicreina preparado según los métodos previamente conocidos. La solución acuosa se somete entonces a un tratamiento para elevar el pH a un valor máximo de aproximadamente 9 y preferentemente desde aproximadamente 10 a 11 o más y lograr una concentración de un mínimo de 5000 U de KI/cc de solución. La solución se somete entonces a tratamiento es decir, enfriar, reposar, germinar, etc. para permitir que de la solución cristalice el KI sustancialmente puro y esencialmente libre de material amorfo.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.

337 146



5. El proceso de la presente invención se puede aplicar a muchos de los materiales de KI preparados según los procesos previamente conocidos. Sobre éste particular se llama especialmente la atención al procedimiento que se menciona en la patente USA Nr. 3.181.997 arriba citada. Estas substancias se pueden disolver en agua destilada, en el caso de que se presente en forma seca, o, en el caso de que sea una solución acuosa del KI el producto empleado en el proceso, entonces ésta solución acuosa se puede utilizar directamente.

10. Los materiales de partida más convenientes son los materiales de KI que ha sido separados de mezclas con impurezas. Contra mayor sea el grado de pureza mayor será el rendimiento durante la cristalización. Un material de partida particularmente útil para el proceso de cristalización de ésta invención es un material KI que haya sido liberado de impurezas hasta lograrse un grado mínimo de impurezas de 10 $\mu\text{g}/\text{U}$ de KI.

15. La solución acuosa se prepara de manera que la concentración en la solución cuando se ajusta al pH adecuado, sea como mínimo de 5000 U de KI preferentemente 100.000 a 1.000.000 U de KI por centímetro cúbico (U de KI cc) de solución. El nivel de pureza del material de partida se regulará preparando apropiadamente las soluciones concentradas.

20. El pH de la solución se ajusta entonces a un nivel de por lo menos 9 mediante la adición de bases orgánicas o inorgánicas o mediante la adición de una resina intercambiadora de aniones fuertemente básica.

25. La base preferida es amonio, sin embargo, como se ha

30.

337 146



se alado, son así mismo eficaces otros materiales básicos. Rendimientos excepcionalmente altos se logran si el pH de la solución se ajusta a valores de 11 y más, mediante amoniaco.

5. Cuando se empleen materiales básicos distintos al amoniaco, el pH óptimo puede diferir del valor que es óptimo con amoniaco. Este valor se puede determinar fácilmente para cada material mediante pruebas.

10. Como ejemplo de las bases inorgánicas que se pueden emplear pueden ser mencionadas la sosa cáustica, la potasa cáustica, el hidroxido de calcio y/o el agua de barita, esto es una solución saturada de hidroxido de bario, y similares.

15. Como ejemplos de las bases orgánicas que se pueden utilizar en el procedimiento de esta invención pueden ser mencionadas las aminas alquílicas tales como la etilendiamina, metilamina, trimetilamina y las aminas heterocíclicas tales como la piperidina y similares.

20. En lugar de elevar el pH de la solución mediante adición de bases orgánicas o inorgánicas se puede lograr el efecto mediante el empleo de una resina intercambiadora de aniones fuertemente básica. La resina se puede utilizar en forma de una columna y fluir la solución a través de dicha columna o bien en una forma que se agrega a la solución y se mezcla con ella

25. formando así una suspensión que a continuación se sedimenta. Resinas intercambiadoras de aniones fuertemente básicas adecuadas son bien conocidas y como guía de ejemplo se puede mencionar la "Amberlita" IRA-410 (marca registrada).

30. La "Amberlita" designa la marca registrada

337 146



- da de las resinas fenólicas modificadas, las resinas fenólicas al 100% y los ésteres de las resinas maleícas como se usan para distintos barnices, esmaltes y tintas de imprenta fabricadas por Rohm y Haas (vease Merck Index 7ª edición, Merck & Co., Inc., pags 1583-4).
5. Es por ejemplo adecuada la "Amberlita" IRA-410 que tiene un tamaño de partícula de 20 a 30 mallas, cargada con una solución de hidróxido sódico. La "Lewatit" MIH es un ejemplo de un intercambiador adicional que se puede
10. emplear. La "Lewatit" MIH se fabrica por Naftone Inc. de New York.

- Cuando se emplea una resina intercambiadora, de aniones, tales como las arriba mencionadas, se obtiene el máximo rendimiento en producto cristalino a
15. un pH de 9 y 10. Cuando se emplean las bases orgánicas o inorgánicas para lograr el pH deseado, los mejores rendimientos aparecen como en el caso del amoniaco, a un pH próximo a 11. Cuando una solución del KI neutra o ácida se somete a concentración en vacío se obtienen
20. cristales. Sin embargo cuando el pH de la solución acuosa se aumenta de acuerdo con ésta invención a un nivel de 9 o más y preferentemente a 11 y más se obtienen unos rendimientos excepcionalmente elevados de cristales puros de KI. Cuando se ha logrado el pH deseado se
25. deja reposar la solución y se inicia la formación de cristales. Una gran cantidad de formación de cristales aparece después de 1 hora, sin embargo los máximos rendimientos se obtienen generalmente después de unas 10 horas. La substancia cristalina se puede aislar mediante
30. filtrado, aspiración, decantación, centrifugado y

337⁹146



ulteriormente lavado y secado de los cristales.

5. Como anteriormente se ha indicado, antes de la presente invención no se había obtenido cristales de KI puros libres de material amorfo. Los cristales resultantes del procedimiento de ésta invención representan, sin embargo, KI esencialmente puro. Los cristales son prismas de 4 lados. Los cristales son rómbicos y pertenecen al grupo espacial $P_{2_1} 2_1 2_1$. Eventualmente pueden quedar uno o más lados oblicuos. Los cristales son de difícil solubilidad en agua.

10. Los cristales se disuelven sin embargo fácilmente rebajando el pH. Es suficiente por ejemplo introducir CO_2 en la suspensión cristalina para disolverla.

15. Bajo condiciones en las cuales el CO_2 está ausente ha sido necesario más de 100 cc de agua a $20^\circ C$, para disolver 1 g de cristales. Por otra parte la solubilidad de los cristales obtenidos por el procedimiento que emplea sulfato de magnesio o de amonio es superior al 10% a ésta misma temperatura. La pureza del material
20. cristalino secado sobre pentóxido de fósforo es de aproximadamente 0,14 microgramos (μg) de material por U de KI. Una suspensión de los cristales en agua tiene un pH de aproximadamente 10.

25. El nuevo material cristalino de KI esencialmente puro de ésta invención es claramente distinto del material KI cristalino previamente obtenido.

30. Una representación diagramática de la sal conteniendo el material cristalino previamente obtenido está mostrado en la figura 1. Esta representación diagramática se preparó de una fotomicrografía de KI crista-

337146

22 FEB 1961



lizado de sulfato de magnesio a un pH ácido de 6. Los cristales eran prismas hexagonales y contenian aproximadamente un 50% de sulfato de magnesio.

5. La figura 1A es una vista en sección transversal tomada a lo largo de la línea 2-2 de la figura 1.

10. Una representación diagramática del nuevo cristal KI esencialmente puro de la presente invención está mostrada en la Figura 2. Esta representación se preparó de una fotomicrografía de cristales de KI obtenidos de acuerdo con la presente invención ajustando el pH de la solución con amoniaco. Los cristales eran prismas de cuatro lados y era KI sustancialmente puro.

15. Una comparación de los espectros de rayos X del KI cristalizado de una solución de sulfato amónico a un pH de 7 con KI cristalizado de solución de amoniaco a un pH de 10 revela claras diferencias entre los cristales. Una reproducción de los espectros de rayos X se presenta en las Figuras 3 y Figura 4. El KI cristalizado de la solución de sulfato amónico a un pH de 7 es el objeto de la Figura 3, mientras que el cristalizado de la solución de amoniaco a un pH de 10 se muestra en la Figura 4. Una comparación de estos espectros de rayos X demuestran que aquellas de sulfato amónico son monoclinicas y pertenecen al grupo espacial P_{2_1} (Figura 3) mientras que aquellos de la presente invención son rómbicos y pertenecen al grupo espacial $P_{2_1 2_1 2_1}$.

20. Otra diferencia esencial entre el KI cristalino de la presente invención y el que se obtiene mediante los medios previamente conocidos consiste en el grado de solubilidad en agua de cada uno. El material cristalino

25.

30.

- 11
337 146



5. obtenido del sulfato de magnesio y que contiene hasta un 50% del mismo se disuelve con facilidad. Por el contrario los cristales de la presente invención son de difícil solubilidad en agua y se pueden lavar con la misma sin pérdidas esenciales.

10. Las composiciones farmacéuticas que contienen el KI de la presente invención permiten la inactivación reversible de la tripsina, quimotripsina, fibrinolisisina (plasmin) y calicreina. Por lo tanto un coágulo de fibrina, que se disuelve completamente mediante una cantidad definida de plasmina, en menos de 1 minuto, se inhibe de disolución por ésta cantidad de plasmina en presencia del inactivador hasta durante 24 horas. La inhibición de la acción de los enzimas promotores de la fibrinólisis se puede mostrar también en el trombelastrógrafo de Hartert, la fibrinólisis activada por la streptoquinásis es inhibida por la adición del preparado de acuerdo con la invención.

20. Ensayos farmacológicos muestran una mayor tolerancia terapéutica. 200-400 U de KI/kg administrado intravenosamente al gato narcotizado no influencia la presión sanguínea. Con dosis esencialmente superiores se presenta una disminución de la presión sanguínea con buena recuperación. En el perro narcotizado no se puede detectar en la presión sanguínea el efecto de la administración intravenosa de 200 KIU/kg.

30. Empleando el método de Langendorff en corazones de conejillos de India aislados, las dosis hasta 2 U de KI no tienen efectividad, pero dosis más elevadas causan un ligero incremento temporal en la amplitud



337146

y 2000 U de KI causan una parada temporal. La preparación no tiene efecto sobre el duodeno aislado del conejillo de India y es asimismo ineficaz con respecto a la cota bronquial en los conejillos de India narcotizados.

5.

La administración subcutánea de una solución al 0,5% del preparado no produce irritación en las orejas de los conejos. La tolerancia general del preparado es buena. Las dosis intravenosas de 20.000-60.000 U de KI/kg se toleran por los ratones blancos sin efectos notables.

10.

Los cristales de KI esencialmente puros obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la presente invención son por ejemplo eficaces en el tratamiento de la necrosis pancrease (cf., por ej. E. Asang: " Wandlungen in der Therapie enzundlicher Erkrankugen der Bauchspeicheldruse" en el archivo de Langenbeck y Deutsche Zeitschrift fur Chirurgie volumen 293, Nr. 5, 1960, pp 645-670).

15.

20.

Es evidente de las indicaciones anteriores referentes a la aplicación farmacéutica del producto cristalino de ésta invención que es útil en igual forma como la substancia de KI hasta ahora conocida pero impura. Adicionalmente, sin embargo, los cristales de la invención muestran nuevas posibilidades esenciales de aplicación. Debido a su baja solubilidad se pueden emplear fácilmente en forma de polvo. Tal polvo puede ser introducido en la cavidad del abdomen durante una operación para evitar adhesiones. En vista de la pequeña solubilidad de la substancia se mantendrá en la cavidad abdo-

25.

30.

337⁻¹³⁻146



minal durante un mayor periodo de tiempo. Además el nuevo producto cristalino se puede emplear en forma de una suspensión de depósito.

5. La invención se ilustra en los siguientes ejemplos, no quedando, sin embargo, limitada a ellos.

Ejemplo 1

10. 4,48 g de un inactivador de calicreina liofilizado con un nivel de pureza de 0,16 g/ U de KI, lo que equivale a 28 mega U de KI se disuelven en 56 cc de agua redestilada; 1 cc de solución contiene entonces 500.000 U de KI.

15. A ésta solución se agregan 56 cc de amoniaco puro al 25%. Después de reposar durante 24 horas a 20°C se ha formado una espesa pasta cristalina que se pasa a través de un filtro basto; se lava con 19 cc de agua destilada y se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo.

20. El rendimiento es de 3,096 g de cristales lo que equivale a 22,12 mega U de KI con una pureza de 0,14 g/U de KI. Esto representa un rendimiento del 79% basado sobre el total de U de KI presente en el material de partida.

Ejemplo 2

25. 20 cc de solución de inactivador de calicreina que tiene una pureza de 0,16 g/ U de KI y es igual a 2 mega U de KI se combinan con 0,63 cc de agua de barita saturada.

30. Después de reposar durante 10 horas a 4°C se filtran los cristales formados a través de un papel filtrante basto, se lava con agua, se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo. El rendimiento es de 129 mg de

-14-
337 146



cristales equivalentes a 920.000 U de KI. Esto a su vez equivale al 46% de grado más puro de 0,14 g/U de KI basado sobre el total de U de KI presente en el material de partida.

5. Ejemplo 3

0,48 g de inactivador de calicreina que tiene una pureza de 0,16 g/ U de KI se disuelven en 30 cc de agua y se agregan entonces 0,39 cc de etilendiamina. Después de un periodo de 15 minutos empieza la cristalización. Después de 24 horas se ha obtenido una pasta cristalina, ésta se separa se lava con un poco de agua y se seca. Se obtienen 239 mg de cristales con una pureza de 0,142 g/U de KI. Esto representa un rendimiento del 56%.

10. Ejemplo 4

1 g de un inactivador de calicreina liofilizado con una pureza de 0,2 g/ U de KI lo que equivale a 5 mega U de KI se disuelven en 10 cc de agua destilada. A ésta solución se agregan 0,6 cc de amoniaco concentrado. Después de 24 horas a una temperatura de 4°C se separan los cristales por filtración, se lavan y se secan. Se obtienen 210 mg. de cristales que tienen un grado de pureza de 0,15 g/ U de KI . Esto significa un rendimiento de 28%.

15. Ejemplo 5

3,4 g de inactivador de calicreina liofilizado con una pureza de 0,17 g/ U de KI se disuelven en 150 cc de agua. El pH es de 6,5. Una vez disueltos se agregan 50 cc de un intercambiador de aniones fuertemente básico "Amberlita" IRA 410. La suspensión se agita

20.
25.
30.



- durante 10 minutos y se deja reposar sin agitar durante 24 horas. La suspensión muestra entonces un pH de 10,5. Mediante suspensión y filtrado de la suspensión de los cristales se separa de los intercambiadores, los cristales se separan por filtración, se lavan en poca agua y se secan. Se obtienen 2,03 g de cristales con una pureza de 0,145 g/ U de KI lo que significa un rendimiento del 70%.

Ejemplo 6

10. 15,4 litros de una fuerte solución ácida del inactivador de calicreina que tiene una pureza de 0,16 g/U de KI, conteniendo por lo tanto 295 millones de U de KI, se dejan fluir durante 6 horas através de una columna intercambiadora que se ha reforzado con 5 litros de una "Amberlita " IRA 410 intercambiadora de aniones fuertemente básica. La solución fuertemente básica obtenida se reduce en un evaporador rotatorio de vacío a 1,5 litros. Durante la concentración de la solución comienza a cristalizar y finalmente se obtienen 71% del volumen total del inactivador de calicreina en forma cristalina.

N O T A

25. 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 el número F 48 504 IVa/30 h de 23 de febrero de 1966,
- 30.



- 16 -

337 146

5. ácogiéndose 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 veinte años en España sobre: " PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INACTIVADOR DE CALICREINA CRISTALIZADO", caracterizándose por lo siguiente:

10. 1.- Procedimiento para la preparación de inactivador de calicreina cristalizado, esencialmente puro, libre de material amorfo y de sales inorgánicas, caracterizado porque comprende la preparación de una solución acuosa de un inactivador de calicreina conteniendo por lo menos 5000 U de KI/ cc de solución, ajustar el pH de la solución mediante adición de por lo menos un miembro seleccionado del grupo compuesto de las bases orgánicas e inorgánicas y resinas intercambiadoras de aniones fuertemente básicas a un pH de por lo menos 9 y mientras se mantiene el pH superior a 9 se cristaliza y se recupera el inactivador de calicreina cristalizado esencialmente puro.

15. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea amoniaco para ajustar el pH a más de 11.

20. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplean bases orgánicas tales como etilendiamina, metilamina, dimetilamina, trietilamina, piperidina y similares.

25. 4.- " Procedimiento para la preparación de inactivador de calicreina cristalizado", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria,

30.

337 146 - 17 -



y en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de diecisiete hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

22 FEB. 1967

FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ A. P. Y MODET
Firmado: F. Hernández Ruiz

337146

FIG.3

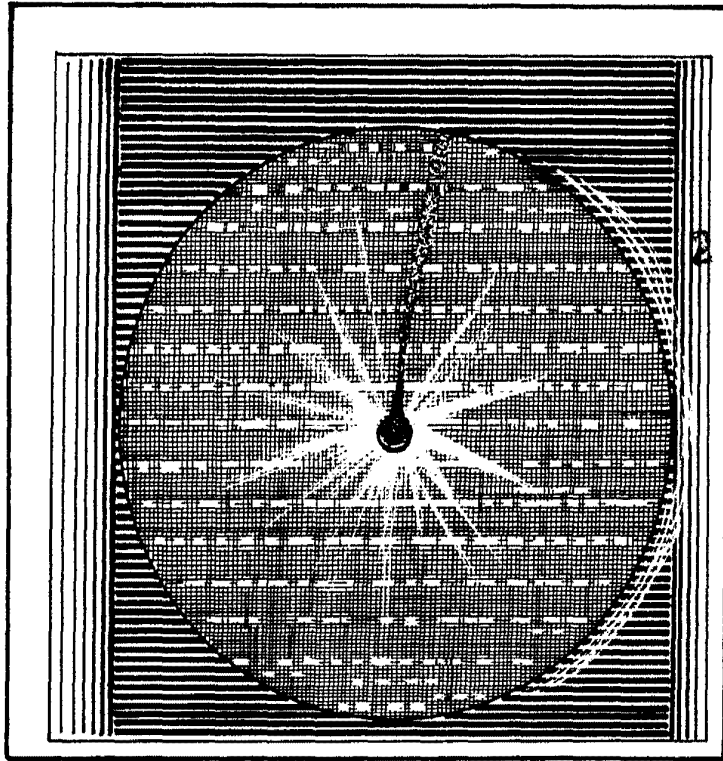
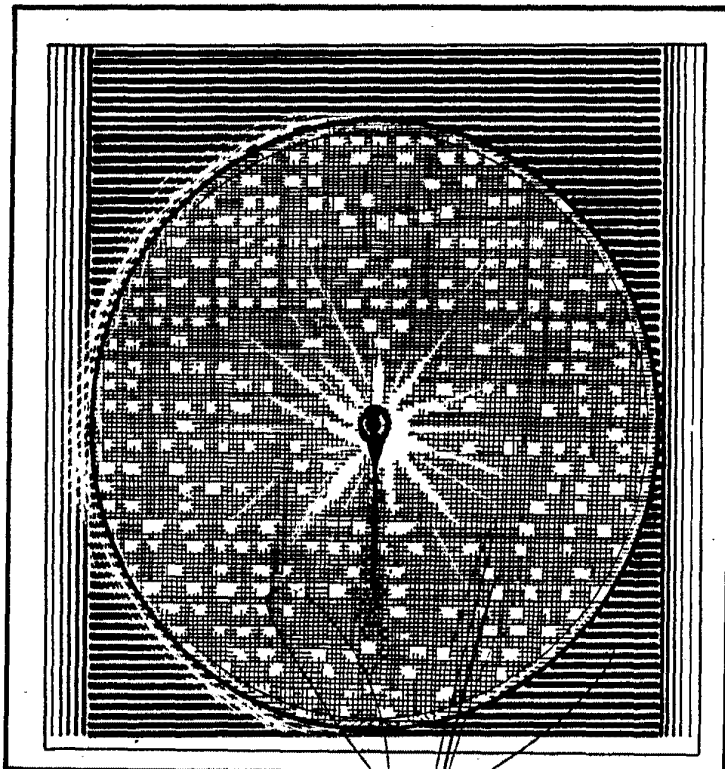


FIG.4



Madrid 22 FEB. 1967

L. GOMEZ ACERO Y MODER

...

