



PATENTE DE INVENCION

Lo A 11 502-Sp.



Memoria Descriptiva

sobre:

" PROCEDIMIENTO PARA LA ESTABILIZACION DE L-ASPARAGINASA "

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

La L-asparaginasa (L-asparagin-amidohidrolasa, E.C. 3.5.1.1.) es conocida.

Se puede obtener mediante extracción de las células E. coli (H. A. Campbell, L. T. Mashburn, E. A. Boyse, L. J. Old, Biochemistry 6 (1967) págs. 721 hasta 730, aquí ulterior.



literatura).

La L-asparaginasa ha alcanzado en los últimos tiempos gran importancia como medicamento frente aquellos tumores que para su desarrollo necesitan L-asparagina.

5. La L-asparaginasa se puede enriquecer según los métodos usuales en la química de las enzimas, por ejemplo, mediante cromatografía ácida, precipitación fraccionada con sulfato amónico o por precipitación fraccionada con disolventes inertes. La purificación de la enzima L-asparaginasa ofrece ciertas dificultades para su obtención en forma cristalina. Estas dificultades estriban en que la L-asparaginasa se presenta en la naturaleza junto con cantidades considerables de proteínas contaminantes que solo se puede separar con dificultad. Se ha propuesto anteriormente (solicitud de patente F 54.410 IVA/6a) un procedimiento basado en la propiedad de que la L-asparaginasa se puede liberar de éstas proteínas contaminantes inactivas hasta un cierto grado, calentando las soluciones en bruto de L-asparaginasa durante 15 minutos a 59,5°C. En estas condiciones se presenta una degradación parcial de las proteínas contaminantes mientras que la enzima, en forma activa, se mantiene en solución. Este procedimiento es complicado y no se adapta bien para el trabajo en escala preparativa, ya que el control de la temperatura y el tiempo ha de ser muy exactos para alcanzar al éxito deseado.
- 10.
- 15.
- 20.
25. Ha demostrado ser especialmente conveniente una proposición más antigua para la purificación de la enzima (solicitud de patentes alemanas P 1642 615,6, P 1767 158.8 y P 1767 157.7). Esta proposición más antigua consiste en fraccionar la L-asparaginasa con polietilenglicol, conduciendo una adición de urea y la graduación al punto isoelectrico de la enzima a pre-
- 30.



parados especialmente puros.

Por la química de las proteínas es sabido que al trabajar con enzimas se han de tener en cuenta diferentes tipos de degradación; por ejemplo, la degradación térmica, la degradación pH extremos y la degradación superficial (J.Biol.Chem 118 (1937) pág. 163 hasta 175).

La degradación térmica se presenta por lo general cuando las proteínas se calientan a temperaturas superiores a los 40°C. Para las distintas proteínas existen, como consecuencia de una estructura de diferente estabilidad, diferencias con respecto a la temperatura límite a partir de la cual se inicia la degradación. Algo similar ocurre también para la degradación debido a pH demasiado elevados o demasiado bajos. La degradación superficial se inicia cuando por acción recíproca con una superficie o por estiramiento en una superficie límite de fases se rompen asimismo puentes de hidrógeno de la proteína. Este último caso se puede producir muy fácilmente por ejemplo por formación de espuma al agitar o al introducir por soplado gases inertes. Solamente el verter una vez una solución de enzimas de un recipiente a otro, puede producir una reducción de la actividad. La degradación superficial se presenta con especial claridad en el punto isoeléctrico, tal y como se conoce por la literatura publicada. También se sabe que la sensibilidad de las proteínas enriquecidas aumenta a medida que se eleva el grado de pureza y que los preparados altamente purificados son especialmente sensibles a los fenómenos de degradación.

Se ha descubierto ahora un procedimiento para la estabilización de L-asparaginasa que consiste en la adición de dos sustancias distintas a las soluciones de L-asparaginasa, de las cuales ya cada una, individualmente, produce un claro efecto



estabilizador, cuya combinación, sin embargo, es especialmente favorable.

5. El procedimiento de la presente invención consiste en agregar a las soluciones de L-asparaginasa aminoácidos, preferentemente glicocol y/o polietilenglicol.

Ya la adición del aminoácido, preferentemente del glicocol, ofrece las siguientes ventajas:

10. 1. Al calentar hasta 60°C se mantiene la actividad total enzimática; no es necesario mantener exactamente la duración del calentamiento.

2. Mejora de la solubilidad de la enzima seca o bien liofilizada. Esto es debido a que se evita totalmente una degradación parcial de la L-asparaginasa.

15. Para la realización del procedimiento según la presente invención se le agregan a las soluciones de la asparaginasa los aminoácidos en cantidades de 0,01 hasta 5,00 % a temperaturas entre -10 y +65°C. En el caso de que a unos 60°C se hayan de degradar las proteínas contaminantes el tiempo de calentamiento asciende de 10 minutos a 4 horas.

20. La solución sobrenadante de un preparado de degradación contiene la L-asparaginasa activa. Esta solución es suficientemente pura para servir como producto de partida para la ulterior obtención de L-asparaginasa pura.

25. Es sorprendente que en el procedimiento de purificación según la presente invención solamente se degradan las proteínas contaminantes inactivas y no la L-asparaginasa ya que, como es sabido, la mayoría de las enzimas son termolábiles.

30. Una combinación de este proceso de estabilización con el procedimiento de purificación más antiguo, ya mencionado, ha conducido a la L-asparaginasa cristalizada pura.

27 MAY 1957



Sin embargo, también la adición de polietilenglicol solo estabiliza la L-asparaginasa frente a distintos tipos de degradación. Este resultado es sorprendente ya que el polietilenglicol no muestra un destacado efecto tensioactivo que pudiera evitar la degradación superficial debido a que se impide la formación de espuma. Contrario a la glicina, anteriormente propuesta como estabilizador, si bien el polietilenglicol posee pares de electrones libres en los átomos de oxígeno, no tiene sin embargo átomos de hidrógeno capacitados para la formación de puentes de hidrógeno. Este efecto estabilizador se presenta en las asparaginasa de distintos grados de pureza. La concentración del polietilenglicol adicionado puede variar entre amplios límites. El efecto estabilizador se demuestra ya claramente con una adición de un 10 %, referido a la L-asparaginasa empleada.

El polietilenglicol se puede adicionar tanto en solución - preferentemente en solución acuosa, pero también en solución alcohólica - como también en forma sólida a la solución L-asparaginasa.

La estabilización de la enzima con glicina se refuerza en forma especialmente favorable mediante la adición de polietilenglicol.

Ejemplos: Estabilización con aminoácidos.

EJEMPLO 1

50 g de asparaginasa en bruto con una actividad de 97 U/mg se disuelven en una disolución tampón de glicocol, pH 8,5 y se calientan durante 1 hora a 60°C, El preparado, que entonces contiene mucha proteína inactiva, degradada, se centrifuga hasta estar claro a 6000 rpm y se fracciona con acetona. La parte que se precipita al agregar de un 40 hasta un 45%



de acetona asciende a 3,9 g. Esta contiene 950 U/mg.

18,6 g de L-asparaginasa enriquecida, recogida de varios preparados de degradación se disuelven en 380 cc de solución 3-molar de urea, se ajusta con sosa cáustica 1-N a un pH de 8,5 y se fracciona con solución al 50 % de polietilenglicol. La parte que se precipita después de agregar 45 hasta 60 cc se separa por centrifugación y se lava con acetona y se seca. Rendimiento: 4,2 g; U/mg 3130.

Una solución de 4,0 g de ésta prueba, en 80 cc de agua bidestilada, se ajusta con ácido clorhídrico 1-N a un pH de 5,2 y se fracciona con solución de polietilenglicol. La parte que se obtiene después de agregar 25 hasta 30 cc se centrifuga, después de reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y después de dejar reposar durante 2 horas bajo acetona se lava con ulterior acetona.

Rendimiento 1,2 g; U/mg 6110.

Esta prueba demostró ser material unitario totalmente cristalizado. Se pudo lograr una recristalización:

1. mediante precipitación de una solución de los cristales en agua a un pH de 4,9 con solución de polietilenglicol y
2. mediante precipitación de la misma solución acuosa con acetona.

Prismas planos; descomposición a partir de 289°C, descomposición total a 292°C.

EJEMPLO 2

5 g de asparaginasa en bruto con 97 U/mg se disolvieron en 100 cc de una solución al 1 % de alanina que, con sosa cáustica, se había ajustado a un pH de 8,5 y se calentó durante 15 minutos a 60°C. El preparado, que contenía mucha proteína degradada se clarificó mediante centrifugación a 6000 rpm. Este



contenia toda la actividad de la asparaginasa.

Mediante ulterior elaboración según el ejemplo 1 es posible obtener también de este preparado de degradación, L-asparaginasa cristalizada.

5. EJEMPLO 3

10. 5 g de L-asparaginasa con una actividad específica de unos 170 U/mg de sustancia se disuelven en 1 litro de agua a temperatura ambiente, las partes que se mantienen insolubles se separan por centrifugación. En la solución así obtenida se introducen a temperatura ambiente, bajo lenta agitación, 10 g de glicocol. Se sigue agitando hasta que se haya disuelto totalmente, la solución se congela y a continuación se liofiliza. Después de agregar el glicocol asciende el valor del pH a 5,2.

15. El efecto estabilizador del polietilenglicol se explica a base de los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 4

20. Un preparado de L-asparaginasa se fraccionó en una columna con Dextrangel y la fracción que contenía la L-asparaginasa fué dializada. La solución contenía 12 400 U con una actividad específica de 251 U/mg.

La primera mitad de esta solución se deshidrató por congelación.

25. Se obtuvo un preparado con una actividad de 5050 U (= 81 % de la actividad inicial) y una actividad específica de 202 U/mg de proteína.

30. La segunda mitad de la solución anterior se mezcló con 0,1 cc de una solución al 50 % de polietilenglicol y después se deshidrató por congelación. El rendimiento ascendió a 6100 U (= 98 % de la actividad inicial) con una actividad específica de 244 U/mg.



EJEMPLO 5

Se ensayaron respectivamente 5 cc de una solución al 0,1 % (g/cc) de L-asparaginasa con un contenido de 146 U/mg en solución tampón 0,2-N de acetato, PH 5,0 de la manera siguiente:

5.

a) Se insufló durante 90 minutos argón puro de manera que se presentó una intensa formación de espuma.

b) Se procedió como en a), pero a la solución se le agregaron previamente 100 mg de polietilenglicol del MG 1500.

10.

c) La solución se agitó durante 3 horas en un recipiente cerrado.

d) Se procedió como en c), pero a la solución se le agregaron previamente 100 mg de polietilenglicol.

15.

e) La solución se mantuvo durante 3 horas en la nevera (Ensayo de control).

Al determinar el contenido de las soluciones a) a e) se obtuvieron los valores siguientes:

a) U/cc = 15

b) U/cc = 140

20.

c) U/cc = 35

d) U/cc = 138

e) U/cc = 146

EJEMPLO 6

Se trataron de modo análogo a los ensayos a) y b) del ejemplo 5, respectivamente, 5 cc de una solución al 0,1 % de L-asparaginasa con un contenido de 146 U/mg en solución tampón $\frac{m}{15}$ de fosfato, pH 7,0.

Al determinar el contenido se encontró:

a) U/cc = 76

30.

b) U/cc = 145



EJEMPLO 7

Un preparado de L-asparaginasa con 100 U/mg de sustancia en seco se disolvió en solución tampón 0,1 M de fosfato (pH 8,0) en una concentración de 1 mg/cc. 6,0 cc de esta solución se diluyeron con 0,5 cc de agua y se calentó en un termostato a 55°C. Simultáneamente se mezclaron 6,0 cc de la misma solución de L-asparaginasa con 0,3 cc de agua y 0,2 cc de una solución al 50 % de polietilenglicol en agua y se sometió a la misma temperatura. Después de periodos de tiempo determinados se tomaron pruebas de los preparados y se comprobó su actividad. Los resultados están indicados en la tabla 1.

Se efectuó un ensayo análogo con el mismo preparado de L-asparaginasa a 60°C. Los resultados están asimismo indicados en la tabla 1.

EJEMPLO 8

Un preparado de L-asparaginasa con aproximadamente 100 U/mg se disolvió en una concentración de 1 mg/cc en solución tritampón 0,1 N (pH 8,0). A muestras de 6,0 cc de esta solución se agregaron, o bien 0,5 cc de agua o 0,5 cc de soluciones acuosas que contenían 50, 100 ó 200 mg de polietilenglicol. La solución se calentó durante 80 minutos a 55°C. Los resultados están indicados en la tabla 2.

EJEMPLO 9

Un preparado de L-asparaginasa de 100 U/mg se disolvió en una concentración de 1 mg/cc en solución tritampón 0,1 N (pH 8,0). Respectivamente se agregaron a 6 cc de esta solución:

a) 0,3 cc de agua

b) 0,2 cc de agua y 0,1 cc de polietilenglicol (al 50 % en agua)

c) 0,2 cc de solución de glicina (100 mg/cc)



d) 0,1 cc de polietilenglicol (al 50 % en agua) y 0,2 cc de solución de glicina (100 mg/cc).

Las soluciones se calentaron durante 80 minutos a 60°C y después se comprobó su contenido en L-asparaginasa. Los resultados están indicados en la tabla 3.

5.



T A B L A 1

Exposición al calor de L-asparaginasa en presencia de polietilenglicol

5.	Duración de la exposición (minutos)	Temperatura (°C)	Actividad de la L-asparaginasa (U/cc)	
			sin aditivo	con polietilenglicol
	0	55	86	104
	20	55	74	103
10.	40	55	62	101
	60	55	61	94
	80	55	43	94
	0	60	91	96
15.	20	60	49	69
	40	60	33	48
	60	60	26	40
	80	60	16	32

20. L-asparaginasa con 100 U/mg disuelta en solución tritampón 0,1 N (pH 8,0)
Concentración 0,92 mg/cc. El aditivo en polietilenglicol ascendió a 15,1 mg/cc.



T A B L A 2

Estabilidad de la L-asparaginasa en dependencia de la cantidad en polietilenglicol

5.	Concentración en polietilenglicol mg/cc	Proporción entre polietilenglicol y enzima mg/cc	Actividad antes de calentar U/cc	Actividad después de 80 minutos a 55°C U/cc	Actividad en % del valor inicial
	0	0	92	43	47
10.	7,5	8,2	98	86	88
	15,0	16,3	98	94	96
	30,0	32,6	98	91	93

El preparado de L-asparaginasa tenía una actividad específica de 100 U/mg peso en seco.

La concentración de la solución ascendió a 0,92 mg/cc. Mediante adición de policera se observó un aumento de la actividad de 92 U/cc a 98 U/cc (=106 %).

T A B L A 3

20. Estabilidad de la L-asparaginasa en presencia de varios estabilizadores

	Actividad de la L-asparaginasa después de calentar durante 80 minutos a 60°C	
	U/cc	% del valor inicial
25. L-asparaginasa sola	14	15
L-asparaginasa con polietilenglicol	44	48
L-asparaginasa con glicina	52	57
L-asparaginasa con polietilenglicol y glicina	83	90



N O T A

- 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 solicitudes de patente presentadas en Alemania nos: P 17 67 617.4 de fecha 29 de mayo de 1.968, P 18 07 447.0 de fecha 7 de noviembre de 1.968 acogiéndose, 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 LA ESTABILIZACION DE L-ASPARAGINASA ", caracterizándose por lo siguiente:
5. 1°. Procedimiento para la estabilización de L-asparaginasa, caracterizado porque a sus soluciones se agregan aminoácidos, preferentemente glicocol y/o polietilenglicol.
10. 2°. Procedimiento según la reivindicación 1°, caracterizado porque se agregan aminoácidos o bien glicocol solo.
20. 3°. Procedimiento según la reivindicación 1° ó 2°, caracterizado porque el aminoácido se agrega en cantidades de 0,01 hasta 5,00 % (g/oc).
25. 4°. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1° hasta 3°, caracterizado porque la adición del aminoácido se efectúa a temperaturas entre -10 y +65°C.
30. 5°. Procedimiento según la reivindicación 1°, caracterizado porque se adiciona polietilenglicol.
- 6°. " Procedimiento para la estabilización de L-asparaginasa ", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
27 MAY 1969

Esta memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 MAY 1969

FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

SUAREZ ACEBO Y MOLINA
Firmado: F. Hernández Ruiz