

376974

Le A 12 084-Sp.

SECCION	INDICA
CLASIFICACION	C
CLAS: <u>A61</u>	_____
SUBCLAS: <u>K</u>	_____



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PRODUCTOS PROTEINICOS
CON MEJORADAS PROPIEDADES DE CONSERVACION.

=====

Solicitante FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad
alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk,
República Federal Alemana.

=====

En el almacenamiento de órganos y tejidos, particularmente aquellos que se han de utilizar para trasplantes, frecuentemente, surgen dificultades causadas por el hecho de que estos órganos y tejidos son destruidos en mayor o menor escala por autólisis post-mortem y como conse-

5.

376974

- 2 -



cuencia son inútiles para el fin anteriormente mencionado. Las proteasas que contienen hongos y bacterias pueden también tener idéntico efecto destructor. Condiciones similares predominan en el caso de alimentos que pueden llegar igualmente a ser inútiles por la acción de proteasas.

5.

Es cierto que los efectos indeseables anteriormente mencionados pueden evitarse más o menos mediante agentes de conservación conocidos, pero el inconveniente de estos métodos consiste en que la mayoría de los agentes de conservación normales no son bien tolerados por el organismo.

10.

Se ha encontrado ahora que los órganos, tejidos y alimentos pueden conservarse mediante inhibidores biológicos de proteasas.

15.

Estos inhibidores biológicos de proteasas poseen la gran ventaja de que son aceptados por el organismo virtualmente sin ninguna complicación. Sin embargo, y de forma más importante, los mismos poseen el efecto de conservación deseado en un grado elevado.

20.

A este respecto, el término "inhibidores biológicos de proteasas" comprende los inhibidores obtenidos de órganos animales, particularmente el conocido inhibidor de calicreina-tripsina, pero también los inhibidores de proteasas de origen vegetal, por ejemplo, los obtenidos a partir de patatas y leguminosas.

25.

Los órganos y tejidos que pueden conservarse de acuerdo con la invención son principalmente el hígado, riñón, corazón, páncreas, pulmón, piel y hueso modular.

30.

Los inhibidores anteriormente mencionados se utilizan preferentemente en soluciones acuosas. Los órganos,

376974



tejidos y alimentos que se han de conservar pueden colocarse en estas soluciones acuosas, pero es posible también inyectar las soluciones acuosas en estos órganos, etc., o permitir que las mismas fluyan a través de los órganos. Sin embargo, también es posible poner los inhibidores en forma sólida y cuando sea necesario, con sustancias de vehículo, en contacto con los órganos que han de ser conservados.

5.

Cuando las soluciones acuosas se utilizan para realizar la conservación según la invención, incluso son suficientes bajas concentraciones para alcanzar el efecto deseado. No obstante, en función de casos especiales, puede ser conveniente usar concentraciones más elevadas.

10.

EJEMPLO 1

15. Se extraen riñones frescos de ratas sanas y se dividen en dos partes mediante una sección central. Un grupo de las mitades de riñones se coloca en una solución fisiológica de sal común y la otra mitad en una solución de sal común en mezcla con el inhibidor de calicreina-tripsina (KTI) a una concentración de 8 mg/ml. Las mitades de riñones se almacenan en estas soluciones a temperatura ambiente en condiciones estériles, se extraen bajo condiciones estériles en distintos tiempos después del comienzo del experimento y se examinan en relación a su estado intacto por medio de métodos histológicos normales, así como por métodos de histoquímica de fermentos. Las piezas de tejido se cortan en el criostato para la histoquímica especial de fermentos, o se fijan con formalina tamponada neutramente o según WOLMAN. El material fijado según WOLMAN se embebe en parafina sobre benzoato de metilo y se emplea para histología normal. El material fijado en formalina se corta en con-
- 20.
- 25.
- 30.



gelación sirviendo para la preparación de hidrolasas.

Se prepararon los siguientes fermentos:

- NADH-citocromo-c-reductasa (NADH-C-R), lactato dehidrogenasa (LDH), glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G6PDH), succino-
5. dehidrogenasa (SDH), citocromoxidasa (CO), esterases sin especificar (UE), fosfatasa alcalinas (AP) y fosfatasa acídicas (SP). El análisis histoquímico de las hidrolasas se lleva a cabo de acuerdo con A.G.E. PEARSE ["Histoquímica; Teórica y Aplicada", 3ª edición; J.a.A. Churchill Ltd. (Londres, 1968)] y los de las otras enzimas de acuerdo con
10. T. BARKA y P.J. ANDERSON ["Histoquímica; Teoría, Práctica y Bibliografía"; Harper y Row, editores, Inc.; New York (1963)]. La coloración histológica se realiza por coloración con hematoxilinaeosina (HE) y la coloración de GOLDNER.
15. El plasma se coloreó sustancialmente en forma más suave con HE después de una incubación de 6 horas en una solución fisiológica de sal común; las células tubulares poseen una apariencia hinchada. Tiene lugar un fuerte aflojamiento por todo el tejido. La actividad de LDH, NADH-C-R
20. y SDH no ha disminuido aún inequívocamente pero existen ya irregularidades de forma y densidad de la gránula. Con G6PDH se observan cambios similares, especialmente en la zona yuxta-medular. El análisis de CO resulta en una coloración llena de manchas. Con UE tienen lugar una distribución y coagulación irregular de la materia coloreada en el
25. aparato tubular; la actividad en la médula ha disminuido. La coloración de SP conduce a una actividad reducida y a una granulación más burda.
30. Después de un almacenamiento durante 6 horas en una solución de KTI, solamente se verifica una pequeña pér-



5. dida en capacidad de coloración con HE, pero siempre resulta una preparación clara; difícilmente se observa un hinchamiento. Las aberturas de las tubulas poseen una línea más definida de demarcación. La coloración de las enzimas anteriormente mencionadas no se desvía generalmente de la fotografía normal. La actividad es fuerte y uniformemente distribuida. El granulado de tinte se conserva bien generalmente.

10. Después de 24 horas más de progresión de la autólisis se encontró sin KTI. El núcleo comenzó a oscurecer y la masa del mismo no pudo colorearse más, particularmente en las secciones internas de las piezas de tejido. Las tubulas exhibían solamente delgadas paredes. La abertura no tenía una apariencia mucho más compacta. El rango total de

15. tejido muestra el comienzo de un fenómeno de desintegración; igualmente, el tejido intersticial de conexión se desintegra sustancialmente. Después de coloración por LDH, NADH-C-R, SDH y CO, las partículas de tinte se aglomeran dando una masa homogénea y el núcleo no se encuentra mucho más claramente

20. demarcado. La actividad de G6PDH se reduce sustancialmente. Las UE han desaparecido completamente. Las AP se encuentran todavía parcialmente presentes con una fuerte actividad, pero solamente en la forma de borrones aglomerados. Las SP tienen una coloración homogénea con una actividad fuertemente reducida.

25.

30. Las estructuras nucleares se encuentran casi todas ellas bien conservadas aún después de 24 horas bajo la acción de KTI. Es exacto que los primeros síntomas de principio de autólisis comienzan a evidenciarse, pero el tejido posee una apariencia compacta y el intersticio se encuentra

-6- 376974



5. todavía bien conservado. La distribución del tinte de las enzimas coloreadas es generalmente más uniforme. La actividad es sustancialmente mejor conservada. Sin embargo, puede reconocerse ya una tendencia de disminución de la G6PDH y las UE no pueden detectarse más. La diferencia en comparación con el control sin KTI es particularmente evidente en el caso de las SP cuya actividad y estructura se encuentran todavía bien conservadas.

10. La descomposición completa se verifica sin KTI después de 5 días. La preparación es casi incolora con HE y solamente son evidenciables aún núcleos aislados. Los contornos ya no pueden reconocerse. La coloración para LDH y NADH-C-R resulta solamente en masas homogéneas. Ya no pueden detectarse CO y AP. Las SP muestran todavía una actividad, pero sin estructuración.

15. Después de almacenar durante 5 días con KTI, son todavía reconocidas estructuras claras del tejido de corteza; las tubulas han mantenido sustancialmente su forma. La coloración para LDH y NADH-C-R muestra todavía una granulación clara. En el caso de la coloración de LDH, las glomerulas se encuentran aún demarcadas por su negatividad. La CO es todavía claramente detectable. La actividad de las SP es más fuerte y mejor distribuida que la de los controles.

EJEMPLO 2

25. Un tejido de hígado de ratas sanas se corta en cubos de 5 mm de longitud de lado y se almacena como en el ejemplo 1 en una solución de sal común con y sin la adición de KTI. El procesamiento y examen ulteriores se llevan a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1.

30. Las reducciones de actividad desiguales se encon-

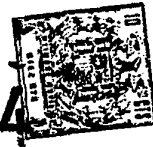
- 7 376974



- traron después de 6 horas con LDH, NADH-C-R y SDH. En la mayoría de las células la G6PDH está sustancialmente reducida; sin embargo, la estructuración y negatividad de los núcleos se encuentran aún conservadas. En el caso de las UE se verifican unos precipitados llenos de manchas. En el caso de las SP la demarcación de los capilares es confusa y la actividad aparece estar heterogeneamente distribuida. Después de almacenar durante 6 horas en una solución que contiene KTI, no exhiben todavía ningún cambio las LDH,
- 5.
10. NADH-C-R, SDH y G6PDH. Las UE han precipitado menos. Las SP están más profundamente demarcadas y más uniformemente distribuidas que las de los controles.

- La descomposición de la estructura tiene lugar después de 24 horas sin KTI. Los lóbulos no se encuentran ya tan distintamente demarcados; el seno tiene una demarcación irregular y exhibe profundas indentaciones. La actividad de LDH, NADH-C-R, SDH y especialmente G6PDH se ha reducido. En la coloración para SP, comienza a ser evidente un principio de descomposición del sistema canalicular,
- 15.
20. junto con una fuerte reducción en actividad. Después de un almacenamiento de 24 horas en una solución de KTI, la demarcación de los lóbulos y seno es más regular. La actividad de LDH, NADH-C-R, SDH y G6PDH es, en general, comparativamente fuerte todavía. También después de la coloración para SP, la actividad es aún sustancialmente más fuerte y el sistema canalicular aparece estar mejor conservado.
- 25.

- Después de 5 días, sin KTI, se encuentra en el caso de LDH, NADH-C-R y SDH una actividad de mínima homogeneidad o apariencia llena de manchas. Solamente las SP exhiben todavía una carga moderada de tinte. Una cierta des
- 30.



- composición de estructura se ha mostrado ahora en las mitocondrias, incluso cuando se almacena en una solución de KPI. No obstante, las LDH, NADH-C-R y SDH muestran todavía una marcada actividad. La actividad de SP es sustancialmente más fuerte que la de los controles.
- 5.

EJEMPLO 3

- Se extraen del esternon humano 2 a 4 ml de médula por medio de una cánula de punción. La médula se suspende en el doble de su volumen de una solución tiródica a la cual, por ml, se han añadido 15 mg de inhibidor de calicreina/tripsina. La suspensión se almacena a -20°C aproximadamente. Cuando transcurrido un año la suspensión se compara con una suspensión correspondiente de células de médula, las cuales fueron preparadas sin la adición de un inhibidor, pero por otra parte en idéntica forma, se encontró en esta suspensión, después de coloración con azul tripano o cosina, más células muertas que en aquella correspondiente a la invención.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 4

- Un hígado humano destinado a utilizarse como trasplante es rociado a través de la vena porta y arteria hepática con una solución tiródica a la cual, por ml, se habían añadido 10 mg de inhibidor de patata. El tejido de hígado permaneció en mejor estado que aquél de otro hígado que no fué tratado. Los cambios autolíticos histológicamente visibles se mantienen claramente otra vez.
- 20.
- 25.

EJEMPLO 5

Conservación de carne con inhibidor de patata (KI)

- 1500 g de carne de vaca se mezclan después de moler con la máquina de picar carne con 30 cc de cultivo de
- 30.



caldo de una cepa psicrófila de *Pseudomonas putrefaciens* que contiene 2×10^6 gérmenes/cc. En cada caso 30 g de este homogeneizado se mezclan con 70 g de agua esterilizada (como control) o bien con una solución del inhibidor de patata (al 2 %) y bajo condiciones estériles se homogeniza con el Ultra-Turrax. Los preparados se almacenaron a 3º durante periodos de tiempo diferentes y a continuación se comprobó el crecimiento de los gérmenes.

5.

Se comprobaron tanto los gérmenes aeróbicos como también anaeróbicos ya que la carne como flora original contiene bacterias de distintas especies.

10.

Los resultados reflejados en la tabla muestran como el crecimiento de las bacterias anaeróbicas como aeróbicas se inhiben claramente por la influencia del inhibidor de patata.

15.

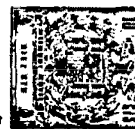
		Gérmenes / cc x 10 ⁶			
		Comienzo del ensayo	3 días	8 días	10 días
aeróbicos	0,0 % KI	5,0	20,0	3.000	20.000
gérmenes	2,0 % KI	5,0	4,5	4,0	5,0
anaeróbicos	0,0 % KI	0,02	0,18	34,6	158,0
gérmenes	2,0 % KI	0,01	0,02	0,08	0,3

N O T A

=====

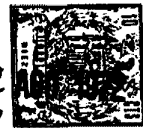
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace cons

20.



- tar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Alemania con el nº P 19 09 965.1 de 27 de febrero de 1969, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PRODUCTOS PROTEINICOS CON MEJORADAS PROPIEDADES DE CONSERVACION; caracterizándose por lo siguiente:
- 5.
10. 1.- Procedimiento para la producción de productos proteínicos con mejoradas propiedades de conservación, caracterizado porque en una primera etapa, se ponen en contacto, bajo condiciones estériles, dichos productos proteínicos con un inhibidor biológico de proteasas; y en una segunda etapa, se hacen reaccionar las enzimas existentes en dichos productos proteínicos con el citado inhibidor biológico, bajo condiciones normales de temperatura y pH, para llevar a cabo la descomposición de dichas enzimas.
- 15.
20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el inhibidor biológico de proteasas se encuentra en una solución acuosa.
- 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la solución acuosa del inhibidor biológico de proteasas se inyecta en los citados órganos.
25. 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la citada solución acuosa del inhibidor biológico de proteasas se hace fluir a través de los órganos.
30. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos órganos se tratan con los citados

ly



376974

inhibidores en forma sólida y, si se desea, con sustancias vehículo.

5. 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque como inhibidor biológico de proteasas se hace reaccionar un inhibidor de calicreina-tripsina.

7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque como inhibidor biológico de proteasas se hace reaccionar un inhibidor de patata.

10. 8.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque como producto proteínico se hace reaccionar hígado humano.

15. 9.- Procedimiento para la producción de productos proteínicos con mejoradas propiedades de conservación, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 11 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

- 7 AGO. 1972

FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY
Por el Firmante La Gestia Foral