



382232 n^o 382.232

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I.P.C.	
CLASE	612 A61
SUBCLASE	K K

PATENTE DE INVENCION

que por veinte años se solicita a favor de CANCER RESEARCH CENTER,
de nacionalidad estadounidense, con domicilio en Columbia,
Missouri 65201 (Estados Unidos), y que ha de recaer sobre "PROCE-
DIMIENTO DE PREPARACION DE LA L-ASPARAGINA AMIDOHIDROLASA QUIMICA-
5 MENTE UNIDA A UN MEDIO DE SOPORTE".

=====

Memoria Descriptiva

El registro de la Patente de Invención que se solicita
tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el
territorio nacional y sus posesiones de un procedimiento de prepa-
ración de la l-asparagina amidohidrolasa químicamente unida a un
10 medio de soporte, conforme se describe a continuación.

382232



ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La l-asparagina amidohidrolasa llamada también corriente-
mente l-asparaginasa es una enzima que, selectivamente, hidroliza
el aminoácido l-asparagina. Esta enzima es obtenible comercialmente
en muy pequeñas cantidades, pero es extremadamente cara.

5 No se sabe que esta enzima descomponga ningún aminoácido
conocido excepto la l-asparagina, y la glutamina en pequeña exten-
sión, y como tal proporciona un modo útil de eliminar selectivamen-
te la l-asparagina libre de las mezclas de aminoácido para experi-
mentación y síntesis bioquímicas, incluso en presencia de tejidos
10 vivos y células. También se ha hallado, recientemente, que ciertas
células cancerosas carecen de la aptitud de sintetizar la l-aspara-
gina y deben obtener el aminoácido de fuentes extrañas. Los traba-
jos en curso indican que si tales células se privan de la l-aspara-
gina, mueren en gran número mientras que otras células permanecen
15 inafectadas. Resulta, así, posible atacar estas células mediante
la administración de la l-asparaginasa.

Una desventaja en la administración de la l-asparaginasa
es el hecho de que las preparaciones obtenibles de esta enzima
pueden también producir efectos indeseables cuando se administran
20 a seres humanos. En otras palabras, un paciente puede desarrollar
una fiebre u otros efectos secundarios a consecuencia de la admi-
nistración de este producto. Esto puede hacer inaconsejable la
administración de dosis de la enzima en una concentración que re-
sulte suficiente para reducir la l-asparagina en un paciente a un
25 nivel que sea fatal para las células cancerosas sensitivas.

También, la l-asparaginasa puede perder su actividad, en
temperaturas ambientes, en una proporción apreciable. En vista de
la escasez de la enzima y de los adversos efectos secundarios cau-
sados por su administración a un paciente, se siente la necesidad
30 de un material que destruya la l-asparagina selectivamente, siendo



sin embargo más estable y apto para ser administrado en menores cantidades, reduciendo así los efectos secundarios y minimizando de este modo tanto las reacciones pirógenas como el consumo de la costosa l-asparaginasa.

5 También, un material insoluble que tenga actividad contra la l-asparagina puede ser usado extracorporalmente, para tratar la sangre u otros fluidos del cuerpo, haciendo pasar la sangre a través del material para destruir la l-asparagina, y entonces retornar la sangre al cuerpo.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente solicitud se refiere al procedimiento de preparación de una composición de materia que comprende una parte al peso de l-asparagina amidohidrolasa, químicamente enlazada a entre 1 y 500 partes al peso de un medio de soporte insoluble en el agua. Preferentemente, la l-asparagina amidohidrolasa, o l-asparaginasa, 15 está covalentemente enlazada al medio de soporte y de 5 a 50 partes del medio de soporte están enlazadas a cada parte al peso de l-asparaginasa. La l-asparaginasa se obtiene del microorganismo E.Coli o de otros microorganismos, así como también de otras conocidas fuentes vegetales o animales, tal como suero de cobayo. 20

La estabilidad de la l-asparaginasa covalentemente enlazada se aumenta sustancialmente, a temperaturas ambiente o cálida, en comparación con la l-asparaginasa libre. Como ventaja adicional, la sustancia resultante puede ser insoluble, permitiendo su recuperación, después de uso, en muchos casos. 25

La l-asparaginasa puede enlazarse a un medio de soporte insoluble por varias técnicas diferentes y puede usarse un gran número de diferentes medios de soporte, por ejemplo: carbohidratos tales como celulosa, dextran, dextrans de eslabón cruzado, tal como sefadex y otros polisacaridos insolubles; proteínas y otros 30

382232²⁸



5 polipeptidos; vinílicos y otros polímeros orgánicos, tal como copolímeros de anhídrido maléico con materiales tales como etileno, estireno, propileno, metil metracrilato, cloruro de vinilo, o butadieno; poliésteres químicamente activados, poliamidas, elastómeros de silicona y poliuretanos; y materiales inorgánicos tal como fibra de cristal, cerámica y altos polímeros inorgánicos. Son, generalmente, preferidos para uso como medios de soporte los carbohidratos y derivados de los mismos.

10 Puesto que los medios de soporte seleccionados están químicamente enlazados a la l-asparaginasa, esta última se hace insoluble, mientras que la composición resultante puede retener todavía la capacidad de descomponer la l-asparagina. La actividad de descomposición de l-asparagina del material resultante, químicamente enlazado, puede tener mayor estabilidad que la de una cantidad comparable de l-asparaginasa bajo condiciones comparables.

15 Los medios de soporte que tienen grupos de ácido carboxílico en suspensión, o grupos anhídridos de ácido carboxílico, pueden ser químicamente enlazados, sin dificultad, a la l-asparaginasa mediante varias técnicas. Ejemplos de tales medios de soporte son la comercialmente obtenible carboximetilcelulosa y carboximetilsefadex, polímeros vinílicos, copolímeros que contienen unidades de ácido maléico, unidades de ácido fumárico o cualesquiera otras unidades vinílicas que contengan grupos ácidos en suspensión tal como carboxietilaliléter, ácidos monocarboxílicos no saturados, como el ácido acrílico y ácidos de aceite secante, o monoalil piro
20 mellitato. Medios de soporte de poliéster y poliamida, que tengan grupos de ácido carboxílico en suspensión, son también fáciles de preparar mediante el uso, en la preparación del polímero, de un exceso de un ácido que tenga tres o más grupos ácidos por molécula, tal como ácido 1, 3, 5-bencenotricarboxílico, ácido piromellítico,



382232

o ácido 1,5,8-octanotricarboxílico en una reacción con un diol o una diamida, respectivamente. Pueden usarse mezclas de ácidos trifuncionales y difuncionales, tales como ácido tereftálico. Otro grupo apropiado de medios de soporte con ácidos carboxílicos suspendidos son las proteínas y otros polipeptidos que contengan ácidos aminodicarboxílicos, tal como ácido aspártico. Por ejemplo, pueden seleccionarse proteínas naturales humanas para ayudar a la supresión de reacciones inmunológicas y alérgicas de los pacientes tratados con el material de esta invención. También pueden activarse químicamente cerámica, vidrio y otras materias inorgánicas, con grupos de ácido carboxílico suspendidos mediante tratamiento con un silano, tal como betacarboxietilmetildiacetoxisilano. Se cree que los silanos, que como el precedente tienen grupos activos hidrolizables, tales como acetato, metóxide ó $\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{C}=\text{NO}-$ condensan con grupos hidroxido sobre materias inorgánicas para formar un enlace químico entre el silano y la materia, desprendiendo ácido acético u otro producto accesorio.

Los medios de soporte que poseen grupos de ácido carboxílico pueden entonces convertirse en una azida de la manera tipificada en el ejemplo 1 que sigue. La azida sufre entonces reacción directamente con la l-asparaginasa, generalmente a una baja temperatura entre aproximadamente 0° y 10° para rendir una aducción covalentemente enlazada de l-asparaginasa y del medio de soporte particular elegido, estando los grupos carbonilo de los grupos de ácido carboxílico de los medios de soporte, directamente enlazados a los átomos de amino nitrógeno o hidroxilo oxígeno de la l-asparaginasa.

Otra técnica para producir un enlace químico entre un medio de soporte que tenga grupos de ácido carboxílico suspendidos y la l-asparaginasa es agregar una diorganocarbodiimida a una mezcla del medio de soporte y de l-asparaginasa, a la manera dada

382232

28



como ejemplo en los ejemplos 2 y 3, para rendir un producto en el cual los grupos carbonilos de los grupos de ácido carboxílico del medio de soporte se enlazan directamente a los átomos de amino nitrógeno de la l-asparaginasa.

5 Similarmente, un enlace directo de amida puede formarse entre un medio de soporte, con grupos de ácido carboxílico suspendidos, que estén activados, como en el caso de un polímero vinílico conteniendo unidades de anhídrido de ácido maléico, mediante reacción directa con grupos amino de la l-asparaginasa, como se ilustra en el ejemplo 5.

10 Un medio de soporte con grupos de ácido carboxílico suspendidos, tal como carboximetildextran, puede hacerse reaccionar con el reactivo K de Woodward (N-etil-5-fenil-isoxazolio-3-sulfonato), y la aducción resultante hacerla reaccionar a su vez con la l-asparaginasa, para rendir una aducción enlazada covalentemente, en la cual los grupos carbonilos del medio de soporte están directamente enlazados a átomos de amino nitrógeno de la l-asparaginasa como se ilustra en el ejemplo 6.

15 Los medios de soporte conteniendo grupos hidroxidos suspendidos pueden enlazarse covalentemente a la l-asparaginasa mediante el uso de una triazina cíclica que tenga al menos dos grupos de clorina carbono-enlazados tal como cloruro cianúrico. Son ejemplos de tales medios de soporte los carbohidratos, tales como celulosa y dextran, y otros polímeros orgánicos de suficiente peso molecular para que sean insolubles en el agua, tales como el alcohol de polivinilo, poli (hidroxietil acrilato) y copolímeros vinílicos de los mismos con materiales tales como metil metacrilato, estireno, y cloruro de vinilo; proteínas y otros polipépticos que contengan una cantidad sustancial (o sea 30 moles %) de silicones hidroxilados, tales como condensados de metil y fenil silanol. Pueden también usarse medios inorgánicos que contengan grupos hidroxilo

20

25

30

382232

28



superficiales, tal como fibra de vidrio y cerámica, arcilla, y gel de sílice.

Igualmente, pueden ser enlazados químicamente a l-asparagi
nasa medios de soporte conteniendo grupos hidroxilo suspendidos,
5 mediante bromuro de cianógeno, como se muestra en el ejemplo 4. La
reacción activadora se desarrolla, generalmente, bajo condiciones
alcalinas, es decir a pH de al menos 7,5 y preferentemente por
encima de 11.

Medios de soporte que tengan grupos amino suspendidos pue-
den ser enlazados a la l-asparaginasa mediante el uso de una dice-
10 tona, diacilcloruro, o dialdehído, como se muestra en el ejemplo 8.
Ejemplos de medios de soporte adecuados son los carbohidratos u
otros hidroxilos que contengan polímeros que hayan sido eterifica-
dos con grupos aminoalquilo tales como aminoetil (como en el ejem-
15 plo 10), aminoisopropil, aminociclohexil o diaminoetil. Otros me-
dios de soporte adecuados son proteínas y polipéptidos que contien-
gan cantidades sustanciales (por ejemplo 20 moles %) de unidades
de aminoácido conteniendo dos o más grupos amino tal como arginina
o lisina, de modo que la proteína o polipéptido contenga un número
20 sustancial de grupos amino suspendidos. Otros medios de soporte
pueden prepararse enlazando químicamente radicales aminoalquilo a
inorgánicos u otros sustratos orgánicos, por ejemplo, haciendo reac-
cionar silanos organofuncionales, tales como aminopropil tricloro-
silano o $(\text{CH}_3\text{O})_2\underset{\text{CH}_3}{\text{Si}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ con sustratos inorgánicos
25 tal como sílice, cerámica, o vidrio en forma de tela o fibras, for-
mando así un enlace químico entre ellos. Silanos de vinilo o alilo
como, por ejemplo, dimetilvinilaminopropil silano, u otras mate-
rias relacionadas, pueden ser homopolimerizadas o copolimerizadas
con materias tales como estireno, etil acrilato u otros silanos
30 de vinilo o alilo para formar medios de soporte orgánicos polimé-

382232



ricos con grupos amino suspendidos.

Otros medios de soporte orgánicos poliméricos que tengan grupos amino suspendidos pueden también usarse, por ejemplo, formando una poliamida mediante reacción de etileno glicol con un exceso de 1,4,8-triaminooctano o 1,3,6-triaminotolueno solo o mezclado con una diamina, tal como hexametilendiamina.

5

Los medios de soporte escogidos con grupos amino suspendidos pueden hacerse reaccionar con un dialdehído, diacilhalido, o dicetona de la fórmula $O=C-R''-\overset{Q''}{C}=\overset{Q''}{O}$, preferentemente en una cantidad molar aproximadamente equivalente a los moles del grupo amino libre presente en el medio de soporte. En la precedente fórmula, Q'' puede ser hidrógeno, halógeno tal como clorina o bromina, o un radical alquilo, y R'' es un radical alquileo de al menos dos átomos de carbono, siendo los enlaces que conectan el radical al resto de la molécula de diferente número de carbono que R''.

10

15

Este compuesto dicarbonilo se hace reaccionar con el medio de soporte para formar un producto de adición de la fórmula

$Q''-\overset{Q''}{C}-R-\overset{Q''}{C}-O$, en la cual Q' es el medio de soporte que posee un doble enlace libre sobre un átomo carbono-enlazado amino nitrógeno del mismo. Este compuesto se hace reaccionar de manera similar con grupos amino libres de la l-asparaginasa para formar una aducción enlazada covalentemente de la fórmula $Q''-\overset{Q''}{C}-R''-\overset{Q''}{C}-Q'''$ en la cual Q''' es la l-asparaginasa poseyendo un doble enlace libre sobre un átomo amino nitrógeno.

20

25

Preferiblemente, el material de esta invención es insoluble en el medio en el cual va a ser usado, por ejemplo agua, sangre u otras soluciones y dispersiones acuosas, tal como aquellos isotónicos con fluidos corporales. Las composiciones de esta invención pueden ser usadas en forma particulada en la cual las partículas son de tamaño visible o bien las composiciones pueden estar en forma particulada muy fina, como en suspensiones coloidales. Es parti-

30

382232



cularmente preferible usar suspensiones coloidales de las composiciones de l-asparaginasa químicamente enlazada que tengan un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 2 micrones para administración directa a sujetos vivos, humanos o animales. Alternativamente, pueden usarse formas solubles del material de esta invención para administración directa, estando preparados dichos materiales mediante uso de carbohidratos solubles, o sus derivados, como medios de soporte.

Como se ha indicado antes, las composiciones de esta invención pueden usarse para reducir el nivel de la l-asparagina en la sangre, fluidos corporales o soluciones reactivas fuera del cuerpo, haciendo pasar la sangre o análogo a través de una capa de una composición insoluble de esta invención. En este caso se prefiere generalmente usar partículas de tamaño más grande, generalmente del orden visible. Puede disponerse un circuito extracorporal empaquetando holgadamente una composición particulada de esta invención dentro de un cartucho, por el cual pasa sangre u otra solución conducida por un tubo hasta un extremo del cartucho, atravesando la composición particulada de la invención y saliendo de la composición particulada a través de un tubo de salida. Si se desea, la sangre puede extraerse directamente de un sujeto y, luego, readministrársele una vez efectuado el tratamiento.

Similarmente, pueden usarse columnas de reacción convencionales conteniendo el material de esta invención, o este último puede ser impregnado en una matriz tal como goma de silicona e incorporado a una tubería, a través de la cual pasa el material líquido a tratar.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos solamente, y no tienen el propósito de limitar el alcance de la invención.



382232

Ejemplo 1

Se calentaron a reflujo, durante cuatro horas, diez gramos de un carboximetildextran comercialmente obtenible, 15 ml de ácido hidroclicórico concentrado, y 250 ml de metanol. El disolvente se eliminó por destilación al vacío y el residuo se suspendió en 50 ml de metanol. Se agregó una solución al 20 % de hidrazina en metanol, agitándolo hasta que no se formó más precipitado blanco. La mezcla resultante tenía un volumen de aproximadamente 100 ml. La mezcla se agitó, entonces, durante cuatro horas, se filtró y se secó. Entonces, se pusieron en suspensión 5 gramos del producto precipitado en 150 ml de ácido hidroclicórico al 2 % y se refrigeró hasta entre 0° y 5°C. Se agregó un exceso de solución de nitrito sódico (50 ml de solución a 14 %, al peso), despacio, agitándolo constantemente, mientras se pulverizaba éter en cantidad necesaria para evitar exceso de espuma en la mezcla.

Resultó un precipitado pegajoso que se filtró y se lavó con metanol. El precipitado consistía mayormente en dextran que poseía unidades $-\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}_3$ enlazadas a átomos de oxígeno del dextran, llamándose este material, vulgarmente, dextran azida.

Se pusieron en un vial a 4°C, agitándolo durante 16 horas, 100 mg del dextran azida preparado como arriba se indica y 10 mg de l-asparaginasa comercialmente obtenible, derivada de E. Coli, conteniendo impurezas de proteína y 5 ml de agua destilada. La píladora resultante de material se lavó con agua y se puso en suspensión en 10 ml de agua. La píladora contenía dextran que estaba covalentemente enlazado a l-asparaginasa mediante un eslabonado mostrado entre los corchetes de la fórmula $\text{R} \left[-\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}- \right] \text{R}'$ en la cual R es dextran enlazado al eslabonado mediante un átomo de oxígeno del dextran, y R' es la l-asparaginasa conectada al eslabonado mediante un átomo de oxígeno o de nitrógeno de la l-asparaginasa. Se cree que una mayor porción de los eslabonados a la l-asparaginasa

382232



están conectados a la misma mediante átomos de amina nitrógeno de la l-asparaginasa.

5 La estabilidad de la precedente dextran-asparaginasa enlazada covalentemente se comparó con la l-asparaginasa libre en un medio de sangre-tampón que tenía 9 partes en volumen de una mezcla de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 en solución acuosa tamponada a pH 7 y una parte en volumen de sangre humana. La concentración de l-asparaginasa libre e impurezas de proteína colocadas en una porción de la mezcla fué de 0,6 mg por ml de mezcla, mientras que la concentración de la asparaginasa enlazada covalentemente, colocada en una porción separada de la mezcla, fué de 0,04 mg por ml de la mezcla. Ambas mezclas se almacenaron a 37°C y su estabilidad fué medida comparando su capacidad de descomponer l-asparagina con el transcurso del tiempo, para rendir amoniaco y ácido aspártico, con la misma capacidad inmediatamente después de su suspensión en el medio de sangre-tampón.

15 Todos los días se ensayaron las mezclas de l-asparaginasa libre y la covalentemente enlazada para comprobar la actividad de su asparaginasa, de la siguiente manera: 1 ml de cada mezcla bajo ensayo se mezcló con 1,7 ml de 0,04 M de solución acuosa de l-asparagina tamponada a pH 8,6 con 0,2 M de solución de ftalato de potasio.

20 La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30 minutos y entonces se agregaron 0,5 ml de ácido tricloroacético a 25% para detener la reacción.

25 La mezcla se centrifugó, entonces, y se añadió medio ml de la solución clara resultante a una mezcla de 7 ml de agua y 0,5 ml de reactivo de Nessler, para la determinación colorimétrica del amoniaco presente, La concentración de amoniaco presente se calculó con referencia a una mezcla standard tratada con reactivo de Nessler.

382232

2



Los resultados fueron como sigue, expresados en micromoles de amoníaco generado por la descomposición de la l-asparagina.

Actividad de las Mezclas de la l-Asparaginasa

Tiempo (en días)	0	1	2	3	7	9
5 Actividad de una mezcla conteniendo dextrán- asparaginasa covalente- mente enlazada (micro- moles de amoníaco gene- rado por unidad de tiempo)	134,0	236,6	267,8	258,9	312,5	357,1
10 Actividad de una mez- cla conteniendo l-aspa- raginasa (micromoles de amoníaco generado por unidad de tiempo)	135,1	166,6	215,2	166,6	122,9	96,1
Tiempo (en días)	11	14	17	21	23	
15 Actividad de una mez- cla conteniendo dex- tran-asparaginasa cova- lentemente enlazada (micromoles de amoníaco generado por unidad de tiempo)	392,8	401,8	401,8	267,8	142,8	
Actividad de una mezcla conteniendo l-asparagi- nasa (micromoles de amoníaco generado por unidad de tiempo).	22,6	11,9	4,7	--	--	

20 Puede verse, así, que la dextran-asparaginasa covalente-mente enlazada ha mejorado, tanto en su estabilidad como en su actividad de asparaginasa en comparación con la l-asparaginasa libre.

Ejemplo 2

25 Se pesaron, en un matraz Erlenmeyer de 25 ml, aproximada-mente 30 a 50 mg de carboximetilcelulosa. A ésto se agregaron 2 ml de solución acuosa de cloruro sódico de 0,5 molar y 2 mg de l-aspa-raginasa. Se agregó gota a gota ácido hidroclicórico diluido para ajustar el pH a entre 3 y 5. Se agregaron entre 3 y 5 mg de dici-

382232₂



clohexilcarbodiimida y 0,2 a 0,5 de mol de tetrahydrofurano (como agente solubilizante) y la mezcla se agitó durante doce a dieciseis horas, impidiendo que el pH caiga por debajo de 4 mediante adiciones periódicas de bicarbonato sódico.

5 El producto resultante se filtró y se lavó con agua. El producto contenía celulosa que estaba enlazada a la l-asparaginasa por un eslabonado mostrado entre los corchetes de la fórmula $R\left[\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]-R'$ en la cual R es celulosa enlazada al eslabonado mediante un átomo de oxígeno libre de la celulosa, R' es l-asparaginasa enlazada al eslabonado a través de uno de sus átomos de oxígeno o de nitrógeno. Se cree que la mayor porción del eslabonado a la l-asparaginasa está conectado a ella a través de átomos de amino nitrógeno de la l-asparaginasa. El producto mostraba actividad de descomposición de l-asparagina.

15 Un producto accesorio de esta reacción es diciclohexilurea.

Ejemplo 3

Resultados generalmente equivalentes a los obtenidos en el ejemplo 2 se logran con la sustitución de la diciclohexilcarbodiimida por 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil)-4-etilcarbodiimida metil-p-toluenosulfonato, o bien por 4-morfolinodimetilaminopropilcarbodiimida, opcionalmente en ausencia de tetrahydrofurano.

Ejemplo 4

25 Se disuelven 2 gramos de bromuro de cianógeno en 50 ml de agua destilada ajustada a un pH de 11,5 mediante adición de solución acuosa de hidróxido de sodio. Se agregan 2 gramos de celulosa previamente hinchada mediante inmersión en 5 M de solución de hidróxido de sodio a 4°C durante 10 días, y la suspensión se agita magnéticamente durante aproximadamente treinta minutos. Se filtra
30 la mezcla y el residuo del filtro se lava primero con agua, y lue-

382232



go con 0,5 de solución molar de bicarbonato sódico seguido por un tampón de ácido bórico-hidróxido sódico a pH 8,5. El residuo se seca mediante una nueva suspensión en acetona y filtrado de succión.

5 50 mg del material resultante, cuya estructura es incierta hasta el presente, se agrega a una solución de 2 mg de l-asparaginasa, suspendida en 3 ml del mismo tampón de borato con un pH de 8,5. La mezcla se agita durante dieciseis horas, manteniéndola a 4°C.

10 El material resultante comprende celulosa químicamente enlazada a l-asparaginasa como se muestra por el hecho de que existe actividad de l-asparaginasa que no puede ser retirada de la celulosa por lavado.

15 La estabilidad del material resultante se ensayó en comparación con asparaginasa libre de la manera descrita en el ejemplo 1.

Los resultados del experimento fueron los siguientes; expresados en términos de porcentaje del amoníaco recuperado en cada día del ensayo, basado en el amoníaco recuperado en el primer día del ensayo.

20	Tiempo (en días)	1	2	3	4	5	6	7
	Actividad de una mezcla conteniendo celulosa-asparaginasa covalentemente enlazada (%)	100	87	201	163	177	157	99
25	Actividad de una mezcla conteniendo l-asparaginasa (%)	100	93	102	135	93	54	46

Ejemplo 5

30 Cuando 5 mg de l-asparaginasa se mezclan, a 4°C, en una solución acuosa de NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, tamponada a pH 7,5, con 50 mg de un copolímero de 50 moles por ciento de anhídrido de ácido maléico o 50 moles por ciento de etileno, se forma una aducción

382232



covalentemente enlazada del copolímero y de la l-asparaginasa, estando la l-asparaginasa enlazada a un grupo carbonilo del copolímero a través de un átomo de amino nitrógeno de la l-asparaginasa para formar un material insoluble que posee actividad de descomposición de la l-asparagina.

Ejemplo 6

En un matraz de 25 ml, se pesan 10 mg de reactivo de Woodward K (N-etil-5-fenil-isoxazolio-3' sulfonato). Se agregan 3 ml de agua y 30 a 50 mg de carboximetilcelulosa. Se filtra la mezcla con succión y se lava con agua. Se agregan 30 a 50 mg del sólido resultante a una solución conteniendo 2 mg de l-asparaginasa dispersa en 2 ml de solución tampón de ácido bórico-hidróxido sódico que tenga un pH de 8,5. La mezcla se agitó a una temperatura de 4°C durante 12 a 16 horas para rendir una aducción covalentemente enlazada de carboximetilcelulosa y l-asparaginasa.

La l-asparaginasa estaba enlazada a la carboximetilcelulosa mediante un eslabonado que se muestra entre los corchetes de la fórmula $R-\left[\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\right]-R'$ en la cual R es celulosa enlazada al eslabonado mediante un átomo de oxígeno de la celulosa, y R' es la l-asparaginasa enlazada al eslabonado mediante un átomo de nitrógeno de la l-asparaginasa. El material descompone selectivamente la l-asparagina.

Ejemplo 7

Resultados generalmente equivalentes a los del ejemplo 6 se obtienen con la sustitución de la carboximetilcelulosa por carboximetildextran, poli (ácido aspártico), poli (ácido glutámico), o proteínas que tengan una concentración total de unidades del ácido aspártico y del ácido glutámico de aproximadamente 30 moles por ciento.

382232

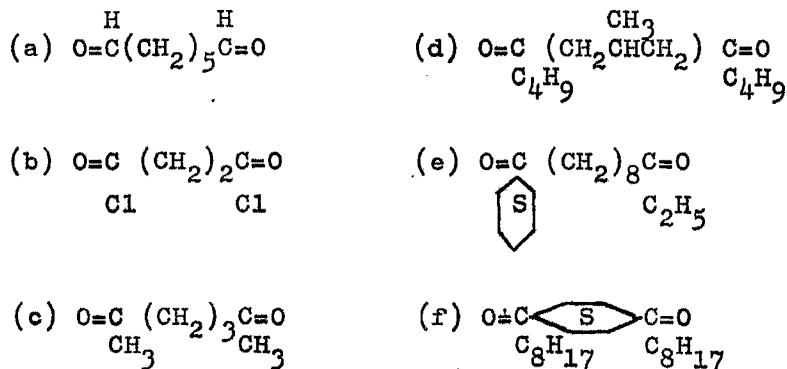


1970

Ejemplo 8

Cuando 10 partes al peso de aminoetilcelulosa se hacen reaccionar con un exceso molar de cualquiera de los siguientes compuestos, a un pH de 4 y a una temperatura de 50°C, se produce una aducción de la aminoetilcelulosa y los compuestos:

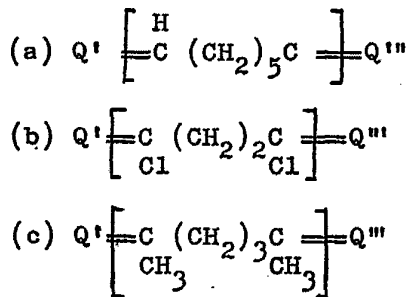
5



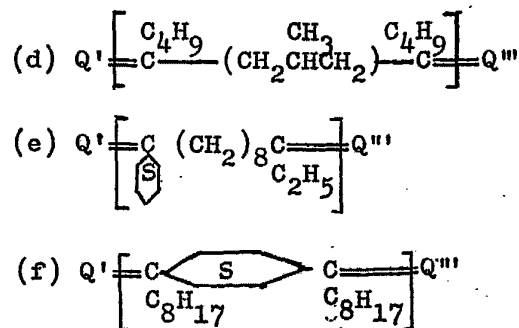
10

Cuando cada una de las aducciones, así formadas, se hace reaccionar con una parte al peso de l-asparaginasa, a un pH de 5 y una temperatura de 4°C, la l-asparaginasa deviene covalentemente enlazada a la celulosa mediante eslabonados de las respectivas fórmulas según se define entre los corchetes:

15



20



382232



en las cuales Q' es aminoetilcelulosa doblemente enlazada al eslabonado mediante un átomo de nitrógeno de la cadena lateral, y Q'' es 1-asparaginasa doblemente enlazada al eslabonado mediante un átomo de nitrógeno de la 1-asparaginasa.

5

Ejemplo 9

Un gramo de carboximetilcelulosa se agitó durante tres horas a la temperatura ambiente con 250 mg de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil)-4-etilcarbodiimida metil-p-tolueno-sulfonato y 15 ml de 0,001 M HCl. Seguidamente a esto, el producto sólido se filtró y se lavó con agua para retirar la carbodiimida libre y, entonces, se lavó con acetona y se secó al aire.

Se agregaron 200 mg del producto sólido seco a 0,2 ml de 1-asparaginasa en 5 ml de agua y se agitó a 4°C durante aproximadamente 12 horas. El producto resultante se centrifugó y decantó varias veces para rendir un producto similar en su naturaleza al del ejemplo 2.

Altos rendimientos de 1-asparaginasa enlazada a carboximetilcelulosa pueden obtenerse repitiendo el experimento de arriba con sustitución de 0,001 M HCl por HCl acuoso al 10 %. Resultados de modo general equivalentes se obtienen con la sustitución de la carboximetilcelulosa por un copolímero de ácido etileno-maléico que tenga 60 moles por ciento de unidades de ácido maléico.

Ejemplo 10

Cuando una cualquiera de las carbodiimidas siguientes se sustituyen por la carbodiimida usada en el ejemplo 9, agregando tetrahidrofurano u otro agente solubilizante según sea necesario, se obtienen resultados generalmente equivalentes:

- carbodiimida
- dimetilcarbodiimida
- dietilcarbodiimida
- diisopropilcarbodiimida
- di-sec-butilcarbodiimida
- difenilcarbodiimida
- dibencilcarbodiimida

30

382232

382232



dioctilcarbodiimida
ditolilcarbodiimida
dinaftilcarbodiimida
di-p-clorofenil-carbodiimida
1-etil-3-aminopropilcarbodiimida
1-etoxietil-3-nitrobutilcarbodiimida

Ejemplo 11

5 Se disolvió un gramo de bromuro de cianógeno en 25 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 11,5 por adición, gota a gota, de 2M de solución de hidróxido de sodio. Se agregó un gramo de un dextran soluble al agua que tenga un peso molecular de 70.000 y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante unos 45 minutos.

10 Después de este período, el producto resultante de la reacción se precipitó mediante adición de acetona, se filtró, y se lavó con acetona nueva.

15 100 mg del producto filtrado resultante se mezclaron con una combinación de 0,1 ml de una preparación de 1-asparaginasa comercial y 5 ml de solución acuosa de bicarbonato sódico. La mezcla se mantuvo a 4°C con agitación durante unas 12 horas, rindiendo una solución de 1-asparaginasa químicamente enlazada a dextran.

20 La solución resultante se pasó, entonces, a través de una columna de agarosa que se había enfriado a 4°C, para aislar el compuesto de dextran-asparaginasa químicamente enlazada. Las fracciones conteniendo este material se probaron para la actividad de descomposición de 1-asparagina del modo siguiente;

25 La solución tomada de la columna de reacción conteniendo la dextran-asparaginasa químicamente enlazada se secó por congelación, y entonces, se volvió a disolver en una solución tampón de ácido bórico-hidróxido sódico que tenía un pH de 8,4. Un ml de esta mezcla se mezcló con 1,7 ml de una solución acuosa ^{de} 0,4 M de 1-asparagina tamponada a pH 8,6 con 0,2M de solución de ftalato de potasio. El material resultante se incubó, entonces, a 37°C duran-



382232

te 15 minutos y se agregó 0,5 ml de ácido tricloroacético al 25 %, para detener la continuación de la reacción.

5 La mezcla se centrifugó y un medio ml de la solución clara resultante se agregó a una mezcla de 7 ml de agua y 0,5 ml de reactivo de Nessler para la determinación colorimétrica del amoníaco presente. La concentración del amoníaco presente se calculó respecto a una mezcla standard tratada con reactivo de Nessler.

Se halló que, bajo estas condiciones, se generaron 32,5 micromoles de amoníaco por mg de proteína presente, por minuto.

10

Ejemplo 12

Se agregaron lentamente 20 g de dextran (peso molecular 215.000) a una solución de 30 g de hidróxido sódico disuelto en 100 ml de agua, para disolver el dextran. La solución se calentó a 75°C y se agregaron, lentamente, 10 g de ácido cloroacético disueltos en 10 ml de agua, en el transcurso de aproximadamente media hora. La solución se dejó enfriar a la temperatura ambiente con agitación continua y se acidificó en un ligero grado con ácido sulfúrico.

20 Se agregaron lentamente 20 ml de la solución resultante a 200 ml de etanol, lo que dió por resultado la formación de un precipitado. Se decantó el metanol, se agregó metanol nuevo y el producto resultante se filtró, entonces, y se lavó con metanol.

25 El producto sólido se volvió a dejar en suspensión en 300 ml de metanol y se agregó un ml de ácido sulfúrico concentrado. La suspensión se sometió luego a reflujo con vigorosa agitación durante 4 horas, se filtró y lavó con metanol cuatro veces. Después de secar al aire el precipitado, se volvió a poner el producto en suspensión en 100 ml de metanol y se agregaron 40 ml de hidrazina, gota a gota; seguidamente se agitó a temperatura ambiente durante siete horas. Después de filtrar el producto resultante, se volvió a lavar en metanol y se secó al aire.

30

382232



1970

Tres gramos del producto resultante se disolvieron en agua fría, refrigerándose a 2°C. Se agregó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado seguido de una adición, gota a gota, de 30 ml de una solución de un 3% al peso de nitrito sódico, continuando la agitación durante aproximadamente una hora y manteniendo la temperatura a 2°C. El producto resultante se dejó entonces precipitar por adición de metanol, se lavó con metanol absoluto y se secó al aire.

El producto resultante, que era una dextran-azida similar a la preparada previamente, se dializó contra agua para retirar los contaminantes de bajo peso molecular.

100 mg del producto sólido se agregaron a 0,1 ml de una l-asparaginasa comercial dispersa en 5 ml de un tampón acuoso de 0,1 molar de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 a pH 7,4.

La mezcla se agitó suavemente, durante aproximadamente 12 horas, a 4°C para formar una verdadera solución de dextran covalentemente enlazado a l-asparaginasa.

La dextran-asparaginasa covalentemente enlazada se aisló mediante el uso de una columna de agarosa y se encontró que había capacidad de descomposición de l-asparagina.

Resultados equivalentes se obtienen cuando el dextran soluble en agua, usado arriba, se reemplaza por dextrina soluble al agua.

Ejemplo 13

Se hinchó celulosa en una solución de 5M de hidróxido sódico, se filtró y se lavó con agua. A 1 gramo de celulosa se le agregó 10 ml de una solución de acetona conteniendo un gramo de cloruro cianúrico. Se agregaron, entonces, inmediatamente, 10 ml de agua destilada y la suspensión se agitó durante 20 segundos. La reacción se amortiguó mediante la adición de un exceso de ácido acético acuoso al 20%.

382232

382.232



La mezcla resultante se filtró con succión y el residuo sólido se lavó con acetona acuosa al 20% fría y luego con acetona seca.

5 El residuo sólido se agregó, entonces, a una mezcla conteniendo 10 ml de solución de cloruro sódico de 5 M y 10 ml de dietanolamina N-(3-aminopropil) de 0,2 M, acuosa, en la cual el pH estaba ajustado a 7,0. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7-1/2 minutos y entonces se agregó exceso de ácido acético acuoso al 20%.

10 La mezcla se filtró con succión y el sólido se lavó con agua y luego con acetona, y se dejó secar por evaporación.

15 100 mg del residuo sólido se agitaron en una dispersión diluida de l-asparaginasa en 5 ml de agua destilada. La mezcla se agitó, a 4°C, durante aproximadamente 12 horas después de las cuales se centrifugó.

El producto sólido resultante contenía l-asparaginasa covalentemente enlazada a celulosa mediante eslabonados que comprendían el residuo de cloruro cianúrico que había reaccionado con la celulosa y la l-asparaginasa.

20 Resultados generalmente similares se obtienen repitiendo el experimento precedente aunque omitiendo el reactivo dietanolamina, o con la sustitución de la aminoetilcelulosa o la dietilaminoetilcelulosa por el ingrediente celulosa de arriba.

NOTA DE REIVINDICACIONES

25 Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de CANCER RESEARCH CENTER, con domicilio en Columbia, Missouri 65201 (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

30 1.- Procedimiento de preparación de la l-asparagina amido-hidrolasa químicamente unida a un medio de soporte, caracterizado en que

Mi

382232



comprende la unión química de una parte, al peso, de l-asparagina amidohidrolasa, a entre cien y quinientas partes, al peso, de un medio de soporte insoluble en el agua.

5 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado en que dicha l-asparagina amidohidrolasa es enlazada covalentemente al medio de soporte.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado en que dicho medio de soporte comprende un carbohidrato.

10 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado en que dicho medio de soporte comprende celulosa.

5ª.-Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado en que dicho medio de soporte comprende dextran.

15 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado en que dicho medio de soporte carbohidrato está modificado con grupos de ácido carboxílico.

7ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero orgánico que tiene grupos suspendidos seleccionados de la clase que consta de grupos de ácido carboxílico y ácido carboxílico anhídrido.

20 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 7ª, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero aminoácido que comprende unidades derivadas de compuestos seleccionados del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico.

25 9ª.- Procedimiento según la reivindicación 7ª, caracterizado en que dicho medio de soporte es un carbohidrato carboximetil modificado.

30 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 7ª, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero vinílico conteniendo grupos suspendidos seleccionados de la clase que consta de grupos de ácido carboxílico y de ácido carboxílico anhídrido.

/a/

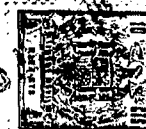
382232



- 11^a.- Procedimiento según la reivindicación 10^a, caracterizado en que dicho medio de soporte es un copolímero de etileno y anhídrido maléico.
- 5 12^a.- Procedimiento según la reivindicación 2^a, caracterizado en que entre cinco y cincuenta partes, al peso, de dicho medio de soporte se hallan presentes por cada parte, al peso, de 1-asparagina amidohidrolasa.
- 10 13^a.- Procedimiento según la reivindicación 2^a, caracterizada en que dicha 1-asparagina amidohidrolasa es enlazada a un medio de soporte que contiene grupos suspendidos seleccionados de la clase que consta de grupos de ácido carboxílico y de ácido carboxílico anhídrido, a través de grupos amida formados mediante reacción entre grupos amina de dicha 1-asparagina amidohidrolasa y dichos grupos suspendidos carboxílicos del medio de soporte.
- 15 14^a.- Procedimiento según la reivindicación 13^a, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero vinílico.
- 15^a.- Procedimiento según la reivindicación 14^a, caracterizado en que dicho polímero vinílico comprende unidades de ácido maléico anhídrido.
- 20 16^a.- Procedimiento según la reivindicación 15^a, caracterizado en que dicho polímero vinílico comprende un copolímero de etileno y ácido maléico anhídrido.
- 17^a.- Procedimiento según la reivindicación 13^a, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero aminoácido.
- 25 18^a.- Procedimiento según la reivindicación 17^a, caracterizado en que el polímero aminoácido comprende unidades derivadas de compuestos seleccionados del grupo que consta de ácido aspártico y ácido glutámico.
- 19^a.- Procedimiento según la reivindicación 17^a, caracterizado en que dicho polímero aminoácido es un polipéptido.
- 30

/L/.

382232



20^a.- Procedimiento según la reivindicación 13^a, caracterizado en que de cinco a cincuenta partes, al peso, de dicho medio de soporte, se hallan presentes por una parte, al peso, de l-asparagina amidohidrolasa.

5 21^a.- Procedimiento de preparación de la l-asparagina amidohidrolasa químicamente unida a un medio de soporte, caracterizado en que comprende poner en contacto un carbohidrato con bromuro cianogeno, bajo condiciones alcalinas, para formar un producto de reacción entre ellos, y seguidamente poner en contacto una parte, al
10 peso, de l-asparagina amidohidrolasa con de 100 a 500 partes, al peso, de dicho producto de reacción para formar una aducción químicamente enlazada que comprenda dicho carbohidrato y l-asparagina amidohidrolasa.

15 22^a.- Procedimiento según la reivindicación 21^a, caracterizado en que la aducción químicamente enlazada se produce por la puesta en contacto de cinco a cincuenta partes al peso de dicho producto de reacción con una parte al peso de l-asparagina amidohidrolasa.

20 23^a.- Procedimiento según la reivindicación 22^a, caracterizado en que dichas condiciones alcalinas, usadas para preparar dicho producto de reacción constituyen un pH de, al menos, 11.

25 24^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado en que se ponen en contacto de 100 a 500 partes al peso de un carbohidrato que tenga grupos suspendidos de la fórmula
$$-\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}_3$$
 enlazada a átomos de oxígeno de dicho carbohidrato, con una parte, al peso, de l-asparagina amidohidrolasa para formar una aducción covalentemente enlazada de dichos carbohidrato y l-asparagina amidohidrolasa.

25^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado en que se ponen en contacto de 100 a 500 partes al peso del

1/4.

382232



producto de reacción de un carbohidrato y una diorganocarbodiimida con una parte al peso de l-asparagina amidohidrolasa para formar una aducción covalentemente enlazada que comprende dichos carbohidrato y l-asparagina amidohidrolasa.

- 5 26^a.- Procedimiento según la reivindicación 25^a, caracterizado en que dicha carbodiimida está seleccionada del grupo que consta de dicitclohexilcarbodiimida, 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil)-4-etilcarbodiimida metil-p-toluenosulfonato, y 4-morfolino-dimetilaminopropilcarbodiimida.
- 10 27^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a y 7^a, caracterizado en que se ponen en contacto de 100 a 500 partes al peso de un medio de soporte polimérico insoluble al agua que tiene grupos de ácido carboxílico anhídrido con una parte, al peso, de l-asparagina amidohidrolasa para formar una aducción covalentemente en-
- 15 lazada que comprende dichos medios de soporte y l-asparagina amidohidrolasa.
- 28^a.- Procedimiento según la reivindicación 27^a, caracterizado en que dicho medio de soporte es un polímero vinílico.
- 29^a.- Procedimiento según la reivindicación 28^a, caracterizado en
- 20 que dicho polímero contiene unidades de anhídrido maléico.
- 30^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado en que se ponen en contacto de 100 a 500 partes al peso del producto de la reacción de un carbohidrato y N-etil-5-fenilisooxazolio-3'-sulfonato, con una parte, al peso, de l-asparagina
- 25 amidohidrolasa para formar una aducción covalentemente enlazada que comprenda dichos carbohidrato y l-asparagina amidohidrolasa.
- 31^a.- Procedimiento de preparación de la l-asparagina amidohidrolasa químicamente unida a un medio de soporte, caracterizado en que se enlaza químicamente l-asparagina amidohidrolasa a entre cien
- 30 y quinientas partes al peso de un medio de soporte soluble en

/s/

382232



agua que comprende carbohidrato, para producir una enzima que descomponga la l-asparagina, teniendo dicha enzima estabilidad y peso molecular incrementados.

5

32ª.- Procedimiento según la reivindicación 31ª, caracterizado en que dicho medio de soporte comprende dextran.

33ª.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE LA L-ASPARAGINA AMIDOHIDROLASA QUIMICAMENTE UNIDA A UN MEDIO DE SOPORTE".

10

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de veintaseis hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 28 de Julio de 1.970

P.A. de CANCER RESEARCH CENTER

Victor Gil Vega