

Nº 388.067

388067



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>207</u> <u>A61</u>
SUBCLASE <u>F</u> <u>K</u>

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: PENTAPHARM A.G.

RESIDENCIA: ENGELGASSE 109, 4002, BASLE, SUIZA

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION
DE UN PREPARADO INHIBIDOR DE LA PEP-
TIDASA.

Prioridad: Patente suiza n.º 1996/70 del 11-2-1970

IN.--

388067



1 El presente invento se refiere a un procedimiento para la elaboración de un preparado inhibidor de la peptidasa a base de un material de partida que contiene inhibidor de la peptidasa.

5 El inhibidor de la peptidasa es un polipéptido - básico que fué aislado del páncreas por M. KUNITZ & J. H. NORTHROP [J. Gen. Physiol. 19, 991-1007 (1936)] y que tie-
10 ne la propiedad de inhibir de manera irreversible o de inac-
15 tivar diversas peptidasas, proteasas y otras sustancias ac-
20 tivas, por ejemplo, la tripsina, la quimotripsina, la cali-
25 creína, la plasmina, fermentos plasmin-activadores, facto-
res coagulantes de la sangre y peptidasas leucocitarias. Los preparados inhibidores de la peptidasa se emplean como medicamentos, por ejemplo, en la terapéutica de la pancrea-
titis. En la bibliografía se emplean en lugar de la expresi-
ón "inhibidor de la peptidasa" también otras denominacio-
nes, por ejemplo, inhibidor de lacalicroína, inhibidor de la proteasa, etc.

El inhibidor de la peptidasa se presenta en diver-
20 sos órganos animales y líquidos del cuerpo, tales como, por ejemplo, el hígado, el bazo, la parótida, el pulmón, los -
ganglios linfáticos, las glándulas parótidas, el intestino, el páncreas o la sangre, en especial de mamíferos, por ejem-
25 plo, de rumiantes, y puede obtenerse de estos materiales -
animales por métodos de extracción.

Son conocidos ya varios procedimientos para la -
30 elaboración de preparados inhibidores de la peptidasa o in-
activadores de la calicroína. Conforme a la patente alemana nº 950.959 se obtiene el inactivador de la calicroína por -
un procedimiento en el que órganos animales frescos, por -



388067

1 ejemplo, glándulas parótidas o ganglios linfáticos, páncreas
o sangre, se desengrasan dos veces con un volumen de aceto-
na cinco veces mayor, se extraen con alcohol acidulado al
70 % y bajo la acción de calor, los extractos se concentran
5 bajo presión reducida y se agitan con éter, el inactivador
de la calicreina se precipita de la fase acuosa con alcohol,
acetona u otro disolvente orgánico miscible con agua, el pre-
cipitado se disuelve en ácido acético diluido, la solución
se ajusta de manera débilmente alcalina para eliminar impu-
10 rezas, y el inactivador de la calicreina se precipita con
alcohol, acetona u otro disolvente orgánico miscible con
agua.

15 En la patente alemana nº 954.284 se describe un
procedimiento para la elaboración de inactivador de la ca-
licreina, conforme al cual se precipitan de extractos acuo-
sos o acéticos de órganos animales desengrasados y secos, -
por ejemplo, de ganglios linfáticos o glándulas parótidas -
de rumiantes, los cuerpos proteicos con ayuda de ácido tri-
cloroacético que convierte en débilmente alcalinas las solu-
20 ciones que contienen el inactivador de la calicreina, y se
mezclan con el mismo volumen de alcohol para precipitar las
impurezas, el filtrado se ajusta a un valor pH de 6, se con-
centra bajo presión reducida, se trata con éter, y el inacti-
vador de la calicreina se precipita con una cantidad de al-
25 cohol diez veces mayor. La obtención de inactivador de la
calicreina a partir de hígado, bazo o calostro por métodos
similares, ha sido descrita en la patente alemana 956.097.

30 De acuerdo con la patente alemana nº 1.011.576 se
obtiene inactivador de la calicreina homogeneizando hígado
de buey y extrayéndolo con ácido tricloroacético diluido en

388067



1 agua, después de lo cual se elimina el ácido tricloroacético
mediante extracción continua con éter, y se precipita el -
inactivador de calicreina por medio de acetona. Según la -
patente alemana nº 1.014.288 se efectúa la precipitación del
5 inactivador de la calicreina agregando a la solución, libe-
rada del ácido tricloroacético, una solución saturada de su-
fato amónico, después de lo cual se disuelve el precipitado
en agua y se precipita el inactivador de la calicreina por
10 medio de ácido pícrico. Para la liberación del inactivador
de la calicreina se disuelve el picrato en un ácido diluido,
cromatografiándose la solución sobre un intercambiador de -
iones débilmente básico y, seguidamente, sobre otro débilmen-
te ácido, del que se eluye el inactivador de la calicreina
mediante un ácido. Otro procedimiento para la elaboración de
15 inactivador de la calicreina ha sido descrito en la patente
alemana nº 1.084.433. Este procedimiento consiste en que -
órganos animales triturados, que contienen el inactivador
de la calicreina, preferentemente parótida, hígado o pulmón,
se extraen con soluciones acuosas que contienen disolventes
20 orgánicos, convenientemente miscibles con agua -preferente-
mente metanol- de sales o hidróxidos de los metales alcali-
notérreos, o bien de sales alcalinas, después de lo cual se
precipita el extracto con una cetona, preferentemente con -
acetona, y en presencia de una sustancia portadora inerte -
25 finamente distribuida, extrayéndose con agua el sedimento -
separado, preferiblemente después de seco, mientras que la
albúmina restante se precipita cuantitativamente con un pre-
cipitante de la albúmina, preferentemente ácido sulfosalicí-
lico, y una vez separado el precipitado, se elimina de la -
30 solución restante el exceso de precipitante de la albúmina,

388067



978

1 con ayuda de intercambiadores de iones. Conforme a la pa-
tente alemana nº 1.146.616 se precipita el inactivador de
la calicreina desde una solución acuosa, libre de sales, -
con ayuda de ácido metafosfórico. Ahora bien, con ello no
5 se obtiene el inactivador de la calicreina en forma libre,
sino como derivado difícilmente soluble. Una variante de es-
te procedimiento se describe en la patente alemana nº - -
1.155.503, conforme a la cual el derivado metafosfórico, di-
fícilmente soluble, del inactivador de la calicreina se dis-
10 grega disolviéndolo en bases o soluciones salinas, liberán-
dose la solución de sales. Asimismo se describe en la paten-
te alemana nº 1.179.333 un procedimiento, que consiste en -
que el inactivador de la calicreina es hecho precipitar de
sus soluciones con ayuda de ácido tánico en una gama de va-
15 lores pH comprendida entre 2,0 y 10,0, con preferencia entre
4,0 y 8,0, después de lo cual se separa el precipitado, se
disgrega disolviéndolo en ácido, y se precipita el inactiva-
dor por medio de disolventes orgánicos miscibles con agua.
Otro procedimiento de precipitación ha sido descrito en la
20 patente alemana nº 1.181.371. Como precipitantes se propo-
nen ácidos polifosfóricos o sus sales hidrosolubles. En es-
te procedimiento hay que evitar el empleo de un exceso de -
precipitante. Preparados de inactivador de la calicreina -
con un grado más alto de pureza se obtienen, según la paten-
25 te alemana nº 1.193.200, precipitando el inactivador de la
calicreina de sus soluciones con ayuda de sales hidrosolu-
bles del ácido metafosfórico, evitando un exceso del preci-
pitante, después de lo cual se separa el precipitado, se dis-
grega disolviéndolo en amoníaco, bases o soluciones salinas,
30 y se libera la solución de las sales por métodos en sí cono

388067



1 cidos. En la patente alemana nº 1.251.911 se propone el-
tina como precipitante. En este procedimiento se trata el
inactivador de la calicreina, en solución acuosa, con elas-
tina y a un valor pH de 7 a 10, después de lo cual se sepa-
5 ra el complejo producido, se disgrega mediante tratamiento
con medios acuosos de un valor pH de 1 a 6, y se libera la
solución de las sales.

10 Un inactivador de la calicreina en forma crista-
lina se obtiene conforme a la patente alemana nº 1.252.364,
si su solución acuosa se ajusta a un valor pH de al menos-
9, bien sea mediante la adición de bases, o bien cambiando
los aniones por iones OH, después de lo cual se concentra -
eventualmente, haciendo que cristalice el inactivador a una
concentración de por lo menos 5000 KIE/c.c.

15 En la patente de medicamentos francesa nº 620 M
se describe un método, por el que se obtiene inhibidor de
la peptidasa a partir de extractos acuosos de páncreas sul-
furados, mediante 15 precipitaciones consecutivas con sulfa-
to amónico y sulfato magnésico, a distintos valores de pH.

20 Conforme a la patente francesa nº 1.483.866 se ob-
tiene inhibidor de la proteasa removiendo una solución acuo-
sa, que contiene el inhibidor en un estado de pureza de 80
a 140 unidades de antitripsina por mg, durante 1 - 16 horas,
preferentemente 3 horas, con 8 - 10 % en volúmen, preferen-
25 temente 5 % en volumen, de óxido de magnesio a 10 - 50° C,
con preferencia a 25° C, después de lo cual se libera la so-
lución del óxido de magnesio afectado de impurezas, y, even-
tualmente, se eliminan los cationes con ayuda de un inter-
cambiador de cationes, para seguidamente precipitar del fil-
30 trado la sustancia activa mediante la adición de 2 - 6 volú



388067

1 ejemplo, aminoácidos, péptidos, proteínas, purinas, nucleósidos, nucleótidos, hidratos de carbono (glucógeno), heparina y otras. En los procedimientos conocidos para la elaboración del inhibidor de la peptidasa se destruyen la mayoría de las
5 otras sustancias en su mayor parte o totalmente, de modo que los residuos de la fabricación no pueden experimentar ningún otro aprovechamiento, siendo por consiguiente desperdicios - carentes de valor. En las precipitaciones salinas se convierten las aguas madres inservibles para otra utilización; además se precipitan por las sales, junto con el inhibidor de la
10 peptidasa, sustancias acompañantes, de lo que resultan precisas complicadas operaciones de purificación con varias etapas de trabajo. Las precipitaciones con disolventes orgánicos no son específicas, puesto que los más diversos péptidos, proteínas, polisacaridas, nucleótidos y sales inorgánicas son precipitados junto con el inhibidor de la peptidasa. En las precipitaciones con disolventes hay que trabajar además casi siempre con volúmenes grandes, de modo que para la recuperación de los disolventes, casi siempre inflamables, se requieren grandes instalaciones técnicas de destilación a prueba -
15 de explosiones. En las precipitaciones mediante ácido pícrico o ácido tánico únicamente se puede eliminar de los extractos el exceso de precipitante con un gasto antieconómico. Algunos de los procedimientos mencionados, tales como, por ejemplo, la cristalización del inhibidor de la peptidasa mediante la adición de bases, la precipitación con elastina, ácido metafosfórico o ácido polifosfórico, únicamente pueden ser -
20 puestos en práctica con concentraciones en las que el inhibidor de la peptidasa esté ya enriquecido fuertemente. Para -
25 la cristalización son apropiadas únicamente soluciones con -
30

388067



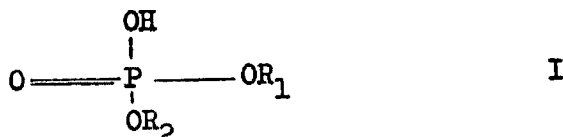
1 al menos 5000 unidades de inactivador de la calicreina -
(KIE) por ml. La precipitación con ácidos meta o polifosfóricos y sus sales es posible tan sólo a partir de soluciones pobres en sales, puesto que ya un contenido de sal de 1 % ó
5 más impide que se produzca el complejo insoluble en agua. Una solución al 1 % de cloruro amónico disocia cuantitativamente el complejo de meta o polifosfato formado en una solución pobre en sal; los productos precipitados son además solubles en el exceso de precipitante. Una precipitación del
10 inhibidor de la peptidasa desde extractos mediante elastina, resulta antieconómica. El empleo de este caro precipitante únicamente puede ser considerado para la purificación ulterior de preparados de inactivador ya enriquecidos. La adsorción en bentonitas es inespecífica, debido a que, además -
15 del inhibidor de la peptidasa, son adsorbidos a la vez los polipéptidos más diversos. Aparte de ésto es estorbado el proceso de adsorción por la presencia de sales. Un procedimiento para la obtención de inhibidor de la peptidasa a partir de extractos brutos o exclusivamente desalbumizados de
20 órganos animales o líquidos del cuerpo, extractos que contengan dicho inhibidor y otras sustancias activas valiosas, en el que se pudiera evitar la destrucción o la pérdida de las otras sustancias activas, no era conocido hasta ahora.

25 Se ha descubierto ahora que el inhibidor polivalente de la peptidasa reacciona fácilmente y de manera específica, también por ejemplo en presencia de otras sustancias activas contenidas junto con el primero en extractos de órganos animales, con ésteres ortofosfóricos, formando un complejo insoluble en agua, si bien soluble en alcoholes inferiores. Este complejo se puede descomponer fácilmente y, al
30



1 descomponerse, suministra el inhibidor de la peptidasa en estado de gran pureza.

5 El presente invento se refiere ahora a un procedimiento para la elaboración de un preparado inhibidor de la peptidasa a base de un material de partida que contiene inhibidor de la peptidasa, procedimiento que está caracterizado por el hecho de que el inhibidor de la peptidasa contenido en el material de partida se transforma, mediante la reacción con un éster ácido del ácido ortofosfórico de la fórmula



10 en la que R_1 representa un radical hidrocarburo con al menos 2 átomos de carbono, y R_2 hidrógeno o un radical hidrocarburo que contiene al menos 2 átomos de carbono, en un complejo insoluble en agua, pero soluble en alcoholes inferiores, complejo que mediante la reacción con una base inorgánica, un ácido mineral o una sal de metal alcalinotérreo soluble en un alcohol inferior, se disgrega para obtener el inhibidor de la peptidasa.

15
20
25 Como materiales de partida para la puesta en práctica del procedimiento conforme al invento son utilizables soluciones acuosas del inhibidor de la peptidasa, por ejemplo extractos acuosos en bruto que se obtienen según métodos en sí conocidos mediante la extracción de órganos animales que contengan inhibidor de la peptidasa o bien de líquidos del cuerpo de mamíferos, en especial de rumiantes, mediante agentes acuosos, eventualmente acidulados. Como materiales de partida son apropiados también extractos acuosos de órganos, de los que se han eliminado ya determinadas

30



388067

1 sustancias acompañantes, por ejemplo, sustancias albuminoi-
deas. Pueden utilizarse, tanto soluciones acuosas que única-
mente contengan el inhibidor de la peptidasa en pequeña con-
centración, como también soluciones ya más concentradas. Co-
5 mo materiales de partida pueden considerarse asimismo solu-
ciones acuosas de preparados de inhibidor de la peptidasa -
insuficientemente puros, que precisen otra purificación. La
transformación del inhibidor de la peptidasa disuelto, en
un complejo insoluble en agua, pero soluble en alcanoles in-
10 feriores, puede realizarse de manera fácil y sencilla, para
lo cual se les agrega a las soluciones o extractos acuosos
del inhibidor de la peptidasa el éster ácido del ácido fos-
fórico como tal, o en forma de una suspensión acuosa o de -
una solución concentrada en un disolvente orgánico, por ejem-
15 plo, cloroformo o etanol, a temperaturas de aproximadamente
0 - 60°, preferentemente a temperatura ambiente, y preferen-
temente agitando. La precipitación del complejo producido -
por la reacción del inhibidor de la peptidasa con el éster
ácido del ácido fosfórico, tiene lugar de manera instantá-
20 nea y completa. La reacción y precipitación del inhibidor
de la peptidasa con el éster ácido del ácido fosfórico es -
específica y no se vé perturbada por la presencia de otras
sustancias activas e impurezas, por ejemplo, sales. Un exce-
so de precipitante tampoco repercute de manera perturbadora
25 en la reacción y precipitación del inhibidor de la peptida-
sa, pudiendo eventualmente ser eliminado fácilmente por in-
tercambio de aniones o mediante una sal o hidróxido de me-
tal alcalinotérreo. Para aumentar la especificidad de la pre-
cipitación es aconsejable, en el caso de soluciones o extrac-
30 tos acuosos fuertemente ácidos, rebajar la acidez. Cuando -

388067

29



1 las soluciones o extractos empleados como materiales de par
tida son alcalinos, hay que emplear cantidades mayores de -
precipitante. El valor pH de las soluciones o extractos acu
5 sos de los que se ha de precipitar el inhibidor de la pepti
dasa con el éster del ácido fosfórico, se ajusta preferente
mente a 5 hasta 7. El complejo de inhibidor de la peptidasa
- éster del ácido fosfórico, puede ser separado al poco -
tiempo de la fase líquida, mediante filtración o centrifuga
ción. Al trabajarse a gran escala técnica es conveniente, -
10 no obstante, dejar reposar la mezcla durante algún tiempo,
por ejemplo, durante una noche. Las aguas madres claras so
brantes pueden ser apartadas en su mayor parte mediante si
fones, con lo que se puede evitar la centrifugación o filtra
ción de volúmenes grandes de líquido.

15 La desintegración del complejo a efectos de ais
lar el inhibidor de la peptidasa, puede realizarse por va
rios métodos. De acuerdo con un primer método de trabajo se
disuelve el complejo inhibidor de la peptidasa - éster del
ácido fosfórico en un alcohol inferior, preferentemente en
20 un alcohol con 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metanol,
etanol, propanol, isopropanol, butanol o isobutanol. Las -
sustancias acompañantes insolubles, por ejemplo, proteínas
posiblemente precipitadas, pueden separarse mediante filtra
ción de la solución alcohólica. El complejo disuelto puede
25 ser desintegrado mediante tratamiento de la solución alcohó
lica con una base inorgánica soluble en alcoholes inferio
res, por ejemplo, un hidróxido de metal alcalinotérreo, tal
como hidróxido sódico o potásico, o bien con amoníaco o una
base amónica cuaternaria, a temperatura ambiente. El inhibi
30 dor de la peptidasa se separa de la solución alcohólica, y
puede ser aislado mediante filtración o centrifugación. El

388067

28



1 componente de éster del ácido fosfórico permanece disuelto
en el alcohol. En lugar de bases inorgánicas se pueden uti-
lizar para la desintegración del complejo y la separación -
del inhibidor de la peptidasa también sales de metales alca-
5 linotérreos solubles en alcohol, por ejemplo, cloruros ta-
les como el cloruro de calcio, de magnesio, de estroncio o
de bario. La desintegración del complejo y la separación
del inhibidor de la peptidasa se pueden realizar asimismo
mediante el tratamiento de la solución alcohólica del com-
10 plejo con un ácido mineral, por ejemplo, ácido clorhídrico
o ácido sulfúrico.

De acuerdo con otro método de trabajo se desinte-
gra el complejo inhibidor de la peptidasa - éster del ácido
fosfórico precipitado, mediante una solución de un ácido mi
15 neral en acetona. El componente de éster del ácido fosfóri-
co queda disuelto en la acetona. El residuo insoluble segre-
gado puede ser recibido en agua. Mediante la neutralización
de la solución, precipitación de sustancias de lastre median-
te un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo, -
20 un alcohol como el etanol, o una cetona como la acetona, fil-
tración y extracción del disolvente orgánico mediante desti-
lación bajo presión reducida, se puede obtener una solución
acuosa concentrada del inhibidor de la peptidasa. El grado
de pureza del preparado inhibidor de la peptidasa puede ele-
25 varse todavía más mediante una renovada precipitación con -
un éster ácido del ácido fosfórico.

Otra forma de realización del procedimiento con-
forme al invento consiste en que los órganos animales o lí-
quidos del cuerpo que contienen inhibidor de la peptidasa,
30 se extraen directamente con una solución del éster ácido del

388067



1 ácido ortofosfórico en un alcohol inferior, que preferente
mente contenga 1 a 4 átomos de carbono. Como material ani-
mal de partida se pueden emplear, por ejemplo, pulmón, higa-
do, bazo, cerebro, corazón, páncreas, ganglios linfáticos,
5 glándulas parótidas, intestino, sangre, tejido muscular, ri-
ñones y glándulas tiroideas de mamíferos, en especial de ru-
miantes, en estado fresco o congelado, o bien en forma de
preparados secos obtenidos por desecación en el vacío o por
liofilización. En la extracción de estos materiales anima-
10 les con la solución alcohólica del éster ácido del ácido or-
tofosfórico reacciona el inhibidor de la peptidasa con dicho
éster, formando un complejo que se disuelve en el producto
alcohólico de extracción. La desintegración del complejo di-
suelto y la segregación del inhibidor de la peptidasa pueden
15 llevarse a cabo por los métodos descritos más arriba.

Esta variante del procedimiento conforme al inven-
to es apropiada especialmente para el tratamiento de mate-
riales de órganos animales obtenidos por liofilización o -
por desecación en el vacío. Es especialmente apropiado el
20 pulmón de buey desecado en el vacío a aproximadamente 60°C.

Como ésteres ácidos del ácido ortofosfórico de la
fórmula I pueden emplearse, por ejemplo, aquellos en los -
que los radicales hidrocarburos designados con R₁ y R₂ son
radicales alcoholes con al menos 2 y, preferentemente, con
25 hasta 20 átomos de carbono, radicales cicloalcoholes, radi-
cales cicloalcohol-alcoholes, radicales arilos o radicales
arilalcoholes. Preferentemente se utilizan ésteres mono o
dialcohólicos del ácido ortofosfórico, o bien mezclas de -
ésteres mono y dialcohólicos, por ejemplo, ésteres mono o -
30 dibutílicos del ácido ortofosfórico, ésteres mono o dioctí-

388067

20



1 licos del ácido ortofosfórico, ésteres mono o didodecílicos
del ácido ortofosfórico, ésteres mono o diestearílicos del
ácido ortofosfórico y otros, o bien mezclas técnicas de los
mono y diésteres citados.

5 El procedimiento conforme al invento posee frente
a los procedimientos conocidos para la elaboración de prepa
rados inhibidores de la peptidasa diversas ventajas sustan-
ciales. La especificidad de la reacción entre el inhibidor de
la peptidasa y el éster ácido del ácido ortofosfórico permi
10 te evitar ampliamente la destrucción o la pérdida de otras
sustancias activas en la extracción de órganos animales o -
líquidos del cuerpo y en el tratamiento de los extractos.
Los residuos del procedimiento conforme al invento son apro-
vechables como materiales de partida para la obtención de -
15 otras sustancias activas de valor terapéutico. Otra ventaja
estriba en que los residuos que se obtienen como desechos ca-
rentes de valor en la elaboración de sustancias activas a -
partir de órganos animales, por ejemplo, en la elaboración
de preparados de acción antianémica a partir de hígado de -
20 buey, pueden ser utilizados como materiales de partida para
la obtención de preparados inhibidores de la peptidasa por
el procedimiento conforme al invento, incluso cuando estos
residuos tengan únicamente un contenido escaso de inhibidor
de la peptidasa. El procedimiento conforme al invento permi
25 te un fuerte enriquecimiento y amplia purificación del inhi
bidor de la peptidasa, incluso cuando se emplean extractos
brutos con un contenido relativamente pequeño de inhibidor
de la peptidasa, en pocas etapas de trabajo realizables de
manera sencilla a gran escala técnica.

30

388067



1978

E J E M P L O 1

1 10 litros de extracto de hígado (obtenido por el
método descrito en "National Formulary", edición IX, 1.950,
páginas 298-299; designado allí como "Liver Fraction nº 1")
5 con un contenido de sustancia seca de 10 % en volumen, fue-
ron mezclados, agitando con 50 ml de dibutilfosfato, y se -
agitaron durante 1 hora. El precipitado floculento formado
se separó mediante filtración, se removió en 250 ml de agua
destilada y se volvió a filtrar. El precipitado lavado se -
10 removió, a efectos de su desintegración, con 500 ml de una
mezcla de 5 partes de HCl al 10 % y 95 partes de acetona.
El residuo, que contenía el inhibidor de la peptidasa, se
disolvió en 100 ml de agua destilada; el valor pH de la so-
lución se ajustó a 8,0 mediante hidróxido sódico, y las sus-
15 tancias no disueltas se separaron mediante centrifugación.
El producto centrifugado se mezcló con 5 ml de dibutilfosfa-
to, ajustándose el valor pH a 5,5. El precipitado producido
fue separado por centrifugación y recibido en 50 ml de alco-
hol absoluto. La solución fue agitada durante 1/2 hora, fil-
20 trándose seguidamente. El filtrado se mezcló con 10 ml de
una solución al 10 % de CaCl_2 en etanol y se dejó reposar
durante 2 días en una cámara frigorífica. El inhibidor de -
la peptidasa, presente en forma de gotitas finísimas, fue -
separado mediante centrifugación, se lavó dos veces, cada -
25 una de ellas con 10 ml de etanol absoluto, y seguidamente
se secó en el vacío. Se obtuvieron 154 mg de una sustancia
blanca, que en total contenía 774.000 KIE. El grado de pure-
za ascendió por consiguiente a 0,2 mcg/KIE. (KIE = unidad -
de inactivador de la calicreina = cantidad de inactivador
30 que en 1 hora, a un valor pH de 8 y a 37° C, inactiva en la

388067 20



1 mitad dos unidades de calicreina. Unidad de calicreina = can-
tidad de calicreina que en inyección intravenosa produce en
la curva de presión de la carótida del perro el mismo efecto
que 5 ml de orina humana recogida de una muestra de recopila-
5 ción de 50 litros y dializada contra agua corriente. Méto-
dos de determinación para la calicreina y el inhibidor de -
la calicreina han sido descritos en "Methoden der enzymatis-
chen Analyse" de H.U. BERGMAYER, Weinheim 1.962, páginas -
880-884).

10

E J E M P L O 2

15

20

25

30

50 kg de pulmón de buey congelado fueron pasados por una máquina de picar carne, se mezclaron con 80 litros de agua desmineralizada y 500 ml de HCl al 37 %, y después se calentaron primeramente durante 1 hora a 60° C, agitando, y a continuación brevemente a 90° C. Después de enfriar a 60° C, se filtró la mezcla a través de un filtro-prensa, y el - filtrado se redujo por evaporación en el vacío a 100 litros. Al producto concentrado se le agregaron 500 g de isooctilorfotofosfato ácido (mezcla aproximadamente equimolar de mono y diéster, corriente en el comercio), a continuación de lo - cual se agitó la mezcla intensamente durante 1 hora, dejándose reposar seguidamente durante 24 horas. La fase líquida - clara superior fué sifonada en su mayor parte. Del precipitado se extrajo el líquido restante mediante centrifugación. el complejo obtenido, no soluble en agua, se incorporó a 1 - litro de agua destilada y se volvió a centrifugar. Después se recibió el residuo en 1 litro de alcohol isopropílico. La so- lución se agitó durante 1/2 hora, filtrándose a continuación. El filtrado se mezcló con 5 ml de una solución de amoniaco - al 25 %, a efectos de precipitar el inhibidor de la peptida-

388067



MAY 1973

1 sa. Para una precipitación completa del inhibidor de la pep-
tidasa en forma de base libre, se mantuvo la mezcla durante
2 días a 0° C, y después se centrifugó. El residuo se lavó
5 dos veces con isopropanol frío, y finalmente se secó en el
vacío. Fueron obtenidas 10.300.000 KIE, con un grado de pu-
reza de 0,4 mcg/KIE.

Las aguas madres obtenidas como consecuencia de la
precipitación con el isooctilortofosfato ácido, pueden ser -
empleadas para la obtención de heparina.

10

E J E M P L O 3

15

20

25

30

100 kg de bazo de buey fueron pasados por la má-
quina de picar carne, se mezclaron intensamente con 50 li-
tros de agua desmineralizada y 4 litros de ácido acético -
glacial y, después de agregar 150 litros de etanol al 95 %, se
agitaron durante 2 horas. La mezcla se dejó reposar duran-
te 24 horas, después se agitó brevemente y a continuación -
se filtró a través de un filtro-prensa. El filtrado se des-
tiló en el vacío para expulsar el alcohol, y se redujo por
evaporación a 50 litros. El producto concentrado se mezcló
con una mezcla de 20° ml de dodecilortofosfato (mezcla apro-
ximadamente equimolar de mono y diéster, corriente en el co-
mercio) y 800 ml de cloroformo, agitándose intensamente du-
rante 1 hora. El precipitado se separó al cabo de 24 horas
mediante sifonado del líquido y centrifugación, y se incor-
poró a 1 litro de agua destilada. Después de separada el -
agua mediante centrifugación, se recibió el residuo en 1 li-
tro de etanol absoluto. La solución se agitó durante 1/2 ho-
ra, y seguidamente se filtró. Del filtrado se precipitó el
inhibidor de la peptidasa mediante la adición de 100 ml de
una solución al 10 % de MgCl₂ en etanol. Para la precipita-

388067



1 ción completa se dejó reposar la mezcla durante 48 horas a
0° C. El residuo sólido fué separado por centrifugación, se
lavó con un poco de etanol enfriado, y se secó en el vacío.
5 De este modo se obtuvieron 19,5 millones de KIE en forma de
11,7 g de sustancia sólida. El grado de pureza obtenido as-
cendió por consiguiente a 0,6 mcg/KIE.

Las aguas madres obtenidas como consecuencia de -
la precipitación con el dodecilortofosfato ácido, pueden -
ser empleadas para la obtención de esplenina.

10

E J E M P L O 4

15

10 kg de pulmón de buey desecado se mezclaron con
15 litros de una solución al 2 % de dodecilortofosfato áci-
do (mezcla aproximadamente equimolar de mono y diéster, co-
rriente en el comercio) en alcohol isopropílico. La mezcla
se agitó durante 2 horas, y después se filtró a través de -
un filtro de vacío. El residuo de la filtración fué recibi-
do nuevamente en 10 litros de una solución al 2 % de dodeci-
lortofosfato ácido en isopropanol, y se extrajo del mismo -
modo. Los extractos reunidos se mezclaron con 40 ml de HCl
20 al 37 % y se dejaron reposar durante 48 horas en una cáma-
ra frigorífica, para precipitar el inhibidor de la peptida-
sa. El residuo sólido obtenido mediante centrifugación se -
lavó con isopropanol frío y seguidamente con un poco de ace-
tona, y se secó en el vacío. De este modo se obtuvieron 8,4
25 millones de KIE con un grado de pureza de 1,3 mcg/KIE.

25

Los residuos de la extracción pueden ser utiliza-
dos para la obtención de heparina.

En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

30

388067

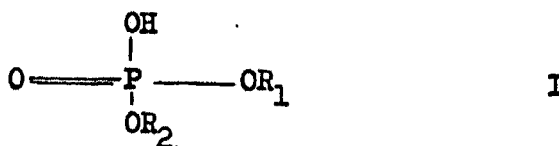


REIVINDICACIONES

1

1. Un procedimiento para la elaboración de un preparado inhibidor de la peptidasa a base de un material de partida que contiene inhibidor de la peptidasa, caracterizado porque el inhibidor de la peptidasa contenido en el material de partida se transforma, mediante la reacción con un éster ácido del ácido ortofosfórico de la fórmula:

5



10

en la que R₁ representa un radical hidrocarburo con al menos 2 átomos de carbono, y R₂ hidrógeno o un radical hidrocarburo que contiene al menos 2 átomos de carbono, en un complejo insoluble en agua, pero soluble en alcanoles inferiores, complejo que mediante la reacción con una base inorgánica, un ácido mineral o una sal de metal alcalinotérreo soluble en un alcohol inferior, se disgrega para obtener el inhibidor de la peptidasa.

15

20

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque como material de partida se emplea una solución acuosa del inhibidor de la peptidasa.

25

3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque a un extracto acuoso obtenido mediante la extracción de órganos animales o líquidos del cuerpo que contienen inhibidor de la peptidasa con un agente líquido, se le agrega el citado éster ácido del ácido ortofosfórico, aislándose y desintegrándose el complejo precipitado.

30

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los órganos animales o líqui-

ME

388067



1 dos del cuerpo que contienen inhibidor de la peptidasa se ex
traen con una solución del citado éster ácido del ácido orto
fosfórico en un alcohol inferior, disgregándose el complejo
contenido en forma disuelta en el extracto.

5 5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindica-
ciones 1 y 2, caracterizado porque el complejo, obtenido en
forma sólida, se disgrega mediante la reacción con una solu-
ción de un ácido mineral, por ejemplo, ácido clorhídrico o
ácido sulfúrico, en acetona, aislándose el inhibidor de la
10 peptidasa, separado en forma sólida.

15 6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindica-
ciones 1 y 2, caracterizado porque el complejo, obtenido en
forma sólida, se disgrega mediante disolución en un alcohol
inferior y reacción con una base inorgánica soluble en alca-
noles inferiores, por ejemplo, un hidróxido de metal alcali-
notérreo, tal como hidróxido sódico o potásico, o amoniaco,
o una base amónica cuaternaria, o con un ácido mineral, por
ejemplo, ácido clorhídrico o sulfúrico, o con una sal de me-
tal alcalinotérreo soluble en alcoholes inferiores, por ejem-
20 plo, un cloruro de metal alcalinotérreo, aislándose el inhi-
bidor de la peptidasa separado en forma sólida.

25 7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindica-
ciones 1 y 4, caracterizado porque el complejo contenido en
forma disuelta en el extracto alcohólico, se disgrega median-
te reacción con una base inorgánica soluble en alcoholes in-
feriores, por ejemplo, un hidróxido de metal alcalino, tal -
como hidróxido sódico o potásico, o amoniaco, o una base amó-
nica cuaternaria, o con un ácido mineral, por ejemplo, ácido
clorhídrico o sulfúrico, o con una sal de metal alcalinoté-
30 rreo soluble en alcoholes inferiores, por ejemplo, un cloru-

ME



1 ro de metal alcalinotérreo, aislándose el inhibidor de la -
peptidasa separado en forma sólida.

5 8. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3 ó 4, caracterizado porque se emplean ésteres -
ácidos del ácido ortofosfórico de la fórmula indicada en la
reivindicación 1, en la que los radicales hidrocarburos de-
signados con R_1 y R_2 son radicales alcoholes que contienen -
al menos 2 y preferentemente hasta 20 átomos de carbono, ra-
dicales cicloalcoholes, radicales cicloalcohol-alcoholes, -
10 radicales arilo o radicales arilalcoholes.

9. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 6 ó 1, 4 y 7, caracterizado porque se emplean al-
canoles inferiores con 1 a 4 átomos de carbono.

15 10. Se reivindica por último, como objeto sobre el
que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE UN PREPARADO INHI-
BIDOR DE LA PEPTIDASA".

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la -
presente Memoria descriptiva que consta de veintidos páginas
mecanografiadas.

Madrid, 8 de Febrero de 1.971
BERNARDO UNGRIA
P.P.

25

30