

14



411602

P.- 53.221  
Nº 1341/2ème add./E

411602

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar 2º CERTIFICADO DE ADICION en ESPANA

a nombre de ROUSSEL-UCIAT

entidad francesa

Int. Cl.:	A61K/C12D
-----------	-----------

F. e. 20-3-75

establecida en 35 Boulevard des Invalides, París 7º,  
Francia

por: Mejoras introducidas en el objeto de la Patente Principal nº 379.815, concedida el 20 de Junio de 1972, por: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ALFA- y BETA-GLICOPROTEINAS LENTAS".

(Clase Internacional C07g)

411602



En la patente principal número 379.815 se ha descrito un procedimiento de preparación de nuevos compuestos de origen bacteriano.

Más particularmente, se ha descrito un procedimiento de preparación de sustancias de naturaleza glicoproteínica secretadas por un germen microbiano o por una mezcla de gérmenes microbianos escogidos del grupo constituido por los Pneumococos, Estreptococos, Neisseria, Micrococos, Estafilococos, Klebsellia Pneumonia y Hemophilus Influenzae o a partir de una mezcla de estos gérmenes o también de una asociación de diferentes tipos de una misma especie microbiana.

Las glicoproteínas así obtenidas poseen propiedades terapéuticas muy interesantes. Están dotadas de propiedades antiinflamatorias considerables y de propiedades inmunizantes rápidas y no específicas. Poseen, además, la ventaja de no ser ni alergizantes ni hipersensibilizantes y de no provocar fenómenos de intolerancia en el momento de la inyección.

Estas glicoproteínas son una mezcla de alfa- y beta-glicoproteínas lentas. Esta estructura es mostrada por el comportamiento electroforético con relación a glicoproteínas de referencia y más particularmente con relación a las glicoproteínas séricas.

Se ha mostrado que la naturaleza química de es

14 FEB 1973



tas sustancias era atestiguada igualmente por reac-  
ciones químicas tales como su contenido en hexosas  
y en pentosas, por la identificación aproximada del  
peso molecular utilizando agentes de cromatografía  
5 selectivos tales como celulosas modificadas, gel de  
Séphadex o tamices moleculares, por el contenido de  
fracción proteínica evaluado por el poder biuretógeno  
calculado con relación al patrón de albúmina de suero,  
por el contenido de hexosaminas y por el contenido de  
10 ácido siálico.

La fracción obtenida a partir de una o varias  
de las cepas arriba mencionadas podía ser definida, por  
esta razón, como constituida por alfa- y beta-glicopro-  
teínas lentas, termoestables, solubles en ácidos y solu-  
15 bles en soluciones de sulfato de amonio.

En la patente principal se ha definido el pro-  
cedimiento de obtención de las alfa- y beta-glicoproteí-  
nas lentas a partir de cultivos microbianos, que consis-  
te esencialmente en cultivar sobre un medio sólido o lí-  
20 quido una cepa microbiana escogida del grupo constitui-  
do por los Pneumococos, Estreptococos, Micrococos,  
Neisseria, Estafilococos, Klebsellia pneumoniae,  
Hemophilus Influenzae o una mezcla de dos o varias ce-  
pas de una asociación de los diferentes tipos de estas  
25 cepas, en recoger, después de pleno desarrollo, los cuer-

411602



pos microbianos de manera manual o automática, en volver a poner en suspensión en un medio acuoso los cuerpos microbianos, en proceder a su lisis o descomposición por vía química, física o enzimática, en separar los residuos de los cuerpos microbianos, en evaporar hasta sequedad la solución transparente así obtenida, en someter al residuo seco a la acción de uno o varios disolventes de los lípidos, en recoger el residuo desprovisto de lípidos con un disolvente acuoso, en desembarazarlos de los prótidos por insolubilización por medios físicos o químicos, en eliminar el precipitado de prótidos y precipitar después selectivamente del líquido acuoso residual desprovisto de prótidos las glicoproteínas lentas por adición de un disolvente o de una mezcla de disolventes miscibles con agua y en purificar si es necesario las glicoproteínas lentas por cromatografía sobre un soporte selectivo.

En una primera solicitud de patente de adición, número 391.350, a la patente principal, presentada el 19 de Mayo de 1971, se ha descrito un nuevo modo de realización del procedimiento objeto de la patente principal.

Este nuevo modo de realización permite obtener las  $\alpha$ - y  $\beta$ -glicoproteínas lentas en una forma más pura y por consiguiente más activa.

La mejora aportada al procedimiento, objeto de

411602

15

FEB



la patente principal, mediante la primera adición,  
está caracterizada porque la lisis de los cuerpos  
microbianos se efectúa por un proceso mixto que rea  
liza una lisis enzimática con una enzima proteolíti-  
ca o micropolisacarolítica, y después de una lisis  
5 química en presencia de un antiséptico organomercú-  
rico o de un ácido mineral u orgánico durante un pe-  
riodo que se extiende entre ocho y quince días; el  
producto bacteriano de la lisis, llevado a sequedad,  
10 es desprovisto de lípidos con una mezcla de metilal  
y de metanol después con un disolvente oxigenado, y  
el producto de la lisis desprovisto de lípidos es a  
continuación desprovisto de prótidos por medios fisi-  
cos, las glicoproteínas son precipitadas selectivamen-  
15 te mediante la adición de una mezcla de metilal y de  
metanol; las alfa- y beta-glicoproteínas lentas así ob-  
tenidas poseen un contenido de hexosas combinadas com-  
prendido entre 50 y 60%.

La presente solicitud de patente de adición tiene como  
20 objeto un nuevo modo de realización del procedimiento se-  
gún la patente principal. Este nuevo modo de realización  
permite obtener las alfa- y beta-glicoproteínas lentas  
del invento bajo una forma todavía más purificada y por  
consiguiente más activa. Este nuevo modo de realización  
25 permite eliminar la mayor parte de los productos de de-

411602



gradación de las proteínas que han podido quedar todavía en la mezcla y, como consecuencia de ello, obtener el producto final en una forma extremadamente purificada.

5 El nuevo modo de realización, objeto de la presente solicitud de patente de adición, está caracterizado porque se somete a las alfa- y beta-glicoproteínas lentas a una diafiltración en solución acuosa sobre una o varias membranas calibradas que desempeñan el papel de tamices moleculares, se las separa así de las fracciones inactivas o poco activas y se recogen las alfa- y beta-glicoproteínas lentas muy puras retenidas por la membrana en la celda de diafiltración, se las somete a una cromatografía sobre gel polimerizado hidrófilo y se recoge la fracción no fijada.

Este nuevo modo de ejecución está caracterizado más particularmente por los puntos siguientes:

1) las membranas de permeabilidad selectiva de estructura reticulada son preferentemente las vendidas bajo la marca AMICON XM 300 (Amicon Corporation - Lexington - Mass U. S. A.)

2) las membranas de permeabilidad selectiva son preferentemente las vendidas bajo las marcas AMICON XM 50, PM 30 y UM 2.

3) el gel polimerizado hidrófilo es el gel

411602

74 FEB. 1976



de Sépharose 6B,

4) el gel polimerizado hidrófilo es el gel de Séphadex G 200.

Las alfa- y beta-glicoproteínas lentas obtenidas por este nuevo modo de realización son definidas por su peso molecular, por su contenido de hexosas combinadas y por la proporción de: hexosas combinadas. proteínas

Se ha encontrado que la fracción muy pura obtenida según este nuevo modo de realización estaba constituida por glicoproteínas que presentaban un peso molecular igual o superior a  $10^6$  daltons, contenía entre 60 y 65% de hexosas combinadas y presentaba una proporción de hexosas sustancias proteicas próxima a 7. Contiene en general aproximadamente 62% de hexosas combinadas. No obstante, por razón de las dificultades de contrastar y graduar la medición de los azúcares, este contenido puede variar entre 60 y 65% sin que sea posible obtener de ello conclusiones acerca de la pureza de la fracción.

El ejemplo que sigue ilustra el invento, pero sin limitarlo.

Preparación de la materia prima.

1) Obtención del extracto bacteriano:

La cepa bacteriana escogida (*Klebsiella pneumoniae*) es cultivada en un fermentador con un medio apropiado. Después de detener el cultivo, los gérmenes



411602

son sometidos a lisis durante ocho días hasta obtener estabilidad de la suspensión bacteriana.

El producto de lisis es a continuación concentrado y desprovisto de lípidos con la mezcla de metilal-metanol (4:1). El residuo de centrifugación es lavado con metanol, recogido con agua y se le aña de formol. El extracto bacteriano es sometido a una última purificación por precipitación de su solución acuosa con la mezcla de metilal-metanol y lavado del precipitado con metanol.

## 2) Propiedades del extracto bacteriano.

El extracto obtenido es transparente y soluble en medio acuoso, no precipita en medio tricloroacético al 10% (en peso/volumen), en ácido perclórico 0,6 N o en sulfato de amonio 3,6 M a pH = 7,0 y a 15°C. Una precipitación parcial se obtiene por adición de una solución de sulfato de manganeso o de cloruro de cetilpiridinio (C.P.C.).

Los principales constituyentes del extracto bacteriano han sido evaluados y las valoraciones han indicado especialmente un contenido de hexosas neutras combinadas de 26 a 32% según los lotes y de 6,2% de nitrógeno alfa-aminado.

### Ejemplo

Se disuelven 2 g de alfa- y beta-glicoproteí-

411602

14 FEB 1974



nas lentas, obtenidas según el modo de trabajo anteriormente descrito a partir de un cultivo de *Klebsiella pneumoniae*, en 400 cm<sup>3</sup> de agua. Se introduce esta solución en una celda de diálisis obturada por una membrana AMICON XM 300. Se mantiene la solución bajo agitación constante y bajo ligera sobrepresión (0,7 barías). Se procede a la diálisis desplazando constantemente el equilibrio de diálisis por compensación del volumen filtrado. A este efecto se añade un volumen igual de agua destilada. Esta aportación se efectúa de una manera continua, y se considera que está terminada la operación de diafiltración cuando el volumen total diafiltrado es igual o superior a 10 veces el volumen inicial. El residuo de la celda de diafiltración es recogido y cromatografiado sobre gel de Sépharose 6B, y la fracción no fijada sobre gel de Sépharose 6B es recogida y llevada a sequedad mediante liofilización.

Se puede trabajar igualmente en varias etapas efectuando en primer término una diafiltración en una celda de diálisis que comprende una membrana AMICON PM 30, y después en una segunda celda de diálisis que comprende una membrana AMICON X 50, y finalmente una tercera diafiltración en una celda que comprende una membrana AMICON XM 300, después de cromatografía sobre gel

411602



de Sépharose 6G y liofilización de la fracción ex-  
cluida se obtiene una fracción idéntica a la obte-  
nida después de una única diafiltración sobre mem-  
brana.

5                   Las alfa- y beta-glicoproteínas lentas así  
obtenidas (retenidas sobre membrana XM 300 y excluidas  
del gel de Sépharose 6B) tienen un peso molecular i  
igual o superior a  $10^6$  daltons. Estas sustancias macro  
moleculares tienen una composición de hexosas superior  
10 a la de las fracciones menos puras obtenidas por el  
procedimiento de la solicitud de patente principal o  
por el de la primera solicitud de patente de adición.  
En general es próxima a 62%. Por el contrario, el con-  
tenido de nitrógeno alfa-aminado es pequeño (1,6%) e  
15 inferior al de las fracciones anteriormente obtenidas.

Las alfa- y beta-glicoproteínas lentas obte-  
nidas según el modo de realización de la presente soli-  
citud de patente de adición no son disociadas más que  
parcialmente por la urea en solución 8 M o por las solu-  
20 ciones de agente reductores. Por el contrario, las molé-  
culas de peso molecular inferior, separadas en el curso  
de las diafiltraciones, pueden volver a asociarse espon-  
táneamente cuando el agente disociador es eliminado. No  
obstante, las macromoléculas así obtenidas "de novo" son  
25 diferentes a las alfa- y beta-glicoproteínas lentas rete

411602

74



nidas sobre membrana AMICON XM 300, si se someten  
las alfa- y beta-glicoproteínas lentas a la acción  
de diversas enzimas (pronasa, tripsina, pancreatina,  
hialuronidasa) seguido por un fraccionamiento sobre  
5 membranas, se comprueba que sólo una pequeña parte de  
las macromoléculas es sensible a estas enzimas y que  
la actividad farmacológica no resulta sensiblemente  
modificada.

El rendimiento de la purificación según el  
10 modo de trabajo anteriormente descrito es de aproxima-  
damente 30 a 35%. Las alfa- y beta-glicoproteínas len-  
tas así obtenidas tienen un contenido de hexosas combi-  
nadas de aproximadamente 62% y un contenido de sustan-  
cias proteicas próximo a 9%, la proporción de  
15 hexosas combinadas es próxima a 7. No obstante, se ha  
sustancias proteicas  
hecho difícil la interpretación por el hecho de que el  
contraste y graduación de las coloraciones con el orci-  
nol no se efectúa más que con los azúcares realmente con-  
tenidos en las alfa- y beta-glicoproteínas lentas pero se  
20 efectúa arbitrariamente en galactosa y en mannososa.

Estudio de estructura.

La hidrólisis ácida bajo vacío permite poner  
en evidencia los diferentes constituyentes de las molé-  
culas después de separación sobre placa de celulosa. Así  
25 se puede poner en evidencia una variedad muy grande de

411602

14 FEB 1973



aminoácidos, lo cual diferencia a estas alfa- y beta-glicoproteínas lentas de los péptidoglicanos y de las osaminas. Se comprueba la presencia de glucosa, galactosa y mannososa entre los azúcares.

5 No se ha puesto en evidencia la presencia de ribosa.

Después de hidrólisis alcalina que entraña una ruptura de los enlaces O-osídilos, el estudio de los fragmentos formados muestra que las cadenas glicánicas largas están injertadas sobre pequeños eslabones proteicos.

10 Se tiene por lo tanto una molécula de naturaleza glicoproteica atestiguada por la naturaleza macromolecular, por la resistencia a las enzimas proteolíticas, por la resistencia a las enzimas lipolíticas (lipasa, pancreatina). Por otro lado no se trata de un mucopolisacárido, 15 dado que ya no es precipitable por el cloruro de cetilpiridilamonio.

La electroforesis en gradiente de densidad a pH = 8,2 en presencia de un tampón de barbital sódico pone 20 en evidencia sobre todo un máximo de movilidad alfa- beta.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia, el 15 de Febrero de 1972, bajo el Nº 72-05016, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de la Propiedad Industrial.

25

31-1-73

411602



REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Certificado de Adición en España, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal N° 379.815, concedida el 20 de Junio de 1972 por: "Un procedimiento para la preparación de alfa- y beta-glicoproteínas lentas", extraídas de cultivos de cepas microbianas escogidas del grupo escogido por los Pneumococos, Estreptococos, Neisseria, Micrococos, Estafilococos, Klebsiella Pneumoniae y Hemophilus Influenzae o a partir de una mezcla de estos gérmenes o de una asociación de diferentes tipos de una de estas especies microbianas, caracterizadas porque

15

20

25

se somete a las alfa- y beta-glicoproteínas lentas a una diafiltración en solución acuosa sobre una o varias membranas calibradas que desempeñan el papel de tamices moleculares, por la utilización de uno o varios tipos de membranas se separan las fracciones inactivas, o poco activas, se recogen las fracciones muy puras retenidas

21.2.73

- 13 -

411602 -1



por la membrana en la celda de diafiltración, se las somete a una cromatografía sobre gel polimerizado hidrófilo y se recoge la fracción no fijada.

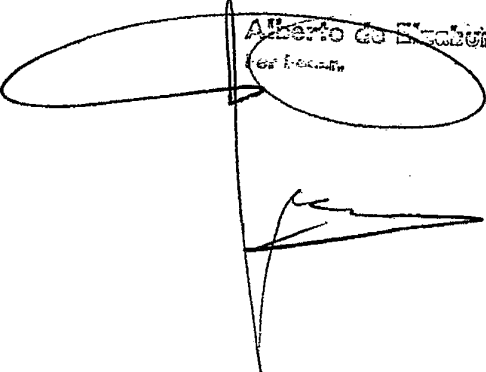
2ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente Principal Nº 379.815, concedida el 20 de Junio de 1972, por: "Un procedimiento de preparación de alfa- y beta-glicoproteínas lentas".


Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, - 1 MAR. 1973

P.A.

  
Alberto de Encabete  
P.A.

  
21.2.73  
JGA