bd/36892
EX-IT

430685

F.C. 26-IV-76

[redacted]

PATENTE DE INVENCION 85

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España, sus territorios y plazas de soberanía, a favor de:

LABORATORI DERIVATI ORGANICI S.p.A.

entidad italiana, domiciliada en Via S. Giuseppe Cottolengo 23/12, Milán, Italia, relativa a:

"METODO PARA LA PRODUCCION DE INHIBIDOR DE PROTEASA, HEPARINA Y OTROS MUCOPOLISACARIDOS"

= = = = = = = = = = =

Inventores: Gianfranco Fedeli y Luigi de Ambrosi

Prioridad: Solicitud de patente en Suiza nº 14265/73 de fecha 5 Octubre 1973.

A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a la producción de un inhibidor de proteasa, más particularmente de calicreína y tripsina, cuyo uso terapéutico se está extendiendo cada vez más y, en algunos casos, es esencial. - - - - - - - - - - - -

Como es bien conocido, la presencia de inhibidor de proteasa ha sido detectada en cierto número de órganos y tejidos de animales tales como páncreas, hígado, pulmones, nódulos linfáticos, parótidas, bazo, sangre, glándulas seminales, etc. (Kraut, H. y colaboradores, Z. physiol. chem. 192, 1 - M Kunitz y J.H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19, 991 - Werle E. y colaboradores, Z. Naturforsch. 14b, 385 - Astrup, T. Acta physiol. scan. 26, 243). Asimismo son también numerosos los métodos estudiados para la extracción a partir de estos tejidos, basándose principalmente estas técnicas en el efecto de extracción selectiva de mezclas acuosas ácidas y alcalinas, fraccionaciones de sales y/o hidroalcohólicas y métodos cromatográficos (véanse las patentes alemanas 1 084 433, 1 148 352, 1 011 576, 956 907, 950 959, 954 284; la patente británica 965 352; la patente francesa 1 566 777; y las patentes japonesas 43-7328 y 44-8563). - -

Todos estos métodos tienen, además del defecto de

ser considerablemente complicados y de requerir un gran número de etapas, el inconveniente, que es muy importante desde el punto de vista comercial, de tener rendimientos más bien bajos acompañados por altos costes. - - - - - - - - -

Es bien conocido que algunos de los órganos de animales enumerados anteriormente contienen también grandes cantidades de heparina, otra substancia de la que existe una alta producción y de la que se realiza un gran consumo en los hospitales, que se extraía de estos órganos recurriendo a la acción solubilizante de algunas enzimas proteolíticas con subsiguiente precipitación de heparina. Tal extracción ha sido gradualmente substituida, sin embargo, en la mayor parte de casos por otros métodos de producción basados en otras fuentes y más provechosos desde el punto de vista industrial. Es innecesario hacer observar que los desechos de la producción de heparina en forma de licores obtenidos después de la precipitación se descartaban y, en cualquier caso, no se utilizaban ya de otra manera, de modo que se convertían, al mismo tiempo, en un problema no despreciable de contaminación. - - - - - - - - - - - - - - - - -

El objetivo principal de la presente invención es proveer un nuevo método para la producción de un inhibidor de proteasa, eventualmente acompañado por la producción de heparina, que es ventajoso desde el punto de vista industrial tanto por lo que se refiere a rendimientos como a costes con respecto a los métodos convencionales. - - - - - -

El método según la presente invención se caracteriza por la siguiente secuencia de etapas: - - - - - - - - -

a) Tratamiento en una disolución acuosa de órganos de animales que contienen el inhibidor, ya sea en su estado original o en forma de polvos y extractos, con una enzima proteolítica elegida de entre las que no atacan al inhibidor, de modo que se realice una lisis, acondicionándose la disolución acuosa de forma compatible con las características y propiedades de la enzima proteolítica específica; -

b) Interrupción de la lisis por desproteinación;

c) Separación del inhibidor por medio de un detergente catiónico; y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

d) Purificación del inhibidor en el grado deseado que es adecuado para el uso al que está destinado. - - - -

De hecho, el método definido anteriormente se basa en varios aspectos, algunos de los cuales son conocidos en sí pero no han sido nunca aplicados a la producción del inhibidor en cuestión. - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Ante todo debe considerarse que el inhibidor de proteasa no es atacado por la mayor parte de varias enzimas proteolíticas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, calicreína, plasmina, elastasa, colagenasa, carboxipeptidasa A y B, ficina, papaína y bromelina (B. Kassel y colaboradores, J. Biol. Chem. 219, 203 - H. Kraut y colaboradores,

Z. physiol. chem. 334, 236 y 348, 1498). Además estos autores y el solicitante han hallado, en particular, que la pepsina, la papaína y la ficina no son inhibidas por el inhibidor de proteasa. Es conocido que algunas de estas enzimas proteolíticas se emplean en las etapas de extracción de heparina a partir de tejidos y órganos que la contienen. - -

Como segunda consideración, se hace observar que, aunque el inhibidor es soluble en varias mezclas de desproteinación, esta solubilidad es alterada en varios grados por las mismas proteínas tal como se hallan presentes en los extractos brutos usuales, que deben eliminarse en la purificación para minimizar las posibles consecuencias productoras de anafilaxis. En la extracción del péptido de los órganos que lo contienen existía por lo tanto el problema de eliminar la interferencia de las proteínas en la solubilidad del inhibidor en cuestión, reduciendo al mismo tiempo los peligros de anafilaxis. - - - - - - - - - - - - - - - - -

Finalmente, el solicitante ha sido capaz de observar que el uso de detergentes catiónicos, tales como bases amónicas cuaternarias, bajo determinadas condiciones, permite que el inhibidor sea purificado de los contaminantes polianiónicos tales como mucopolisacáridos, ácidos nucléicos y numerosas substancias pirogénicas. Así puede resultar útil el uso de estos detergentes, además de la purificación, para reducir también los peligros pirogénicos en el producto final. Es conocido ahora que para la producción de heparina se utilizan detergentes catiónicos para aislar las subs

tancias de los caldos de extracción que las contienen. - -

De la anterior consideración aparecerá claramente, sin duda, que existe una cierta afinidad entre la producción de heparina según la técnica anterior y el método hallado y sugerido por el solicitante para obtener el inhibidor de proteasa. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Otro objetivo de la presente invención es por lo tanto combinar en un solo procedimiento la extracción de heparina con la del inhibidor de proteasa, procedimiento que, en comparación con las etapas ya conocidas para la producción de heparina, se caracteriza por el uso de enzimas proteolíticas que no atacan al inhibidor de proteasa y, con respecto a la producción específica del inhibidor, se caracteriza porque se trata la fracción líquida que se descartaba hasta ahora, como resultado de la precipitación de la heparina, mucopolisacáridos y/o substancias pirogénicas, a fin de concentrar y purificar el inhibidor. - - - - - - - - - -

Además, el solicitante ha sido capaz de observar, y ello es confirmado por los ejemplos que seguirán, que el método objeto de la presente invención es ventajoso no sólo porque permite utilizar, bajo condiciones particulares, residuos que hasta ahora se descartaban y revalorizar de nuevo, desde el punto de vista industrial, un método obsolescente para producir heparina y mucopolisacáridos sino también porque los rendimientos de inhibidor son substancialmente más altos que los de los métodos convencionales y se obtie-

nen simultáneamente mejoras en la purificación y en la eliminación de los contaminantes. - - - - - - - - - - - - - - -

En este momento es apropiado dejar claro que en la obra de B. Kasell, "Methods Enzymology", Vol. 19, páginas 848-850 puede hallarse una lista más completa de las enzimas proteolíticas que pueden utilizarse en el método de la presente invención. - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Considerando ahora con mayor detalle el método de la presente invención debe observarse que: - - - - - - - -

1) Preferentemente, la enzima proteolítica que se utiliza en la etapa de extracción y solubilización es una enzima que no es desactivada por el inhibidor en cuestión; más particularmente, esta enzima se elige del grupo compuesto por papaína, ficina, bromelina, tanto en forma aislada como en materiales y tejidos que las contienen. - - - - - -

2) Al interrumpir la lisis se recurre a agentes desproteinantes usuales y/o al suministro de calor de modo que se eleve la temperatura de la disolución acuosa con los métodos que son bien conocidos en la técnica. - - - - - - -

3) Con respecto a las bases amónicas cuaternarias, ha demostrado ser particularmente ventajoso el uso de bromuro de cetilpiridinio y de cetiltrimetilamonio. - - - - - -

4) Para el aislamiento y la purificación del inhibidor, después de la separación de heparina y de mucopolisa

cáridos, se prefiere recurrir a la acidulación con ácido tricloroacético al 2-5%, con fraccionación subsiguiente por adición de sulfato amónico hasta obtener una concentración de entre 0,45 y 0,9 de la concentración de saturación. - - - -

La purificación adicional del inhibidor puede realizarse por fraccionación alcohólica y/o acetónica y por filtración con gel o cromatografía en gel. - - - - - - - -

Los ejemplos siguientes tienen el fin de ilustrar mejor el método de la invención sin por ello introducir una limitación indebida. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 1

Diez (10) kilogramos de pulmón picado de buey, se han suspendido en 16 litros de agua destilada. Después de un calentamiento suave de la masa a 40ºC se ha añadido, con agitación, una suspensión de 20 gramos de papaína en 4 litros de un citrato tampón 0,25 M a un pH de 5,5, que contiene 200 gramos de sulfato magnésico. La temperatura se ha ajustado a 55ºC y la masa se ha mantenido en estas condiciones durante 4 horas. Entonces el pH se ha ajustado a 6,2 por adiciones de amoníaco concentrado y la masa se ha calentado a 90ºC. Subsiguientemente, se ha filtrado todo bajo presión y el residuo se ha descartado. El líquido claro se ha tratado con cetilpiridinio hasta que se ha obtenido una completa floculación de los polianiones. Entonces se ha efectuado la filtración a fin de recoger el precipitado que

contiene heparina mientras que el líquido se ha complementado con ácido tricloroacético hasta una concentración final de 3%. Después de 30 minutos se ha realizado de nuevo una filtración a presión al tiempo que se efectuaba el lavado del filtro con 4 litros de ácido tricloroacético al 3%. Así, se han obtenido 32 litros de un líquido claro que tenía una actividad de 610 U.I. de inhibición por centímetro cúbico (U.I. = unidad de inhibidor, véase Z. Physiol. Chem. 182, 1 - 1930), equivalente a un rendimiento de $1,95 \times 10^6$ U.I. por kg de órgano de partida. Esta disolución se ha sometido luego a fraccionación con sulfato amónico entre 0,5 y 0,9 de saturación recogiendo el precipitado por centrifugación. En este estado se han obtenido 85 gramos de precipitado que contiene $1,9 \times 10^7$ U.I. (aproximadamente un 98% de la actividad total según se obtiene en la lisis) mientras que el contenido del material proteínico era de 36,5%, lo que indica una pureza de 1,56 microgramos por U.I. Las otras purificaciones realizadas con los métodos que son convencionales en la técnica han permitido obtener 465 centímetros cúbicos de una disolución apirogénica que tenía una actividad tan alta como de 32.000 U.I. por centímetro cúbico, esto es un total de $1,49 \times 10^7$ U.I., hecho que indica un rendimiento de 76% en comparación con la actividad inicial. La pureza, tal como se halla en el análisis del material proteínico, era de 0,143 microgramos por U.I. - - - - - - - -

Un ensayo comparativo de una porción correspondiente del mismo órgano, en estado picado, por extracción

con etanol al 70% en presencia de cloruro cálcico (véase la patente alemana 1 084 433) ha dado un rendimiento de 0,875 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano respecto al producto bruto y 0,322 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano con una pureza de 0,14 microgramos por U.I. respecto al purificado. Estos datos, comparados con los obtenidos por la lisis papaínica corresponden a rendimientos de 21,7% respecto al producto purificado y de 46% respecto al producto bruto. Otro ensayo, realizado también en una cantidad correspondiente del mismo órgano, pero picado, aplicando el método revelado por B. Kassell en "Methods Enzymology" Vol. 19, página 845, ha dado un rendimiento de producto bruto de 1,020 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano y de 0,418 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano respecto al órgano purificado. Estos datos, comparados con los obtenidos por lisis papaínica corresponden a rendimientos del 53,6% respecto al producto bruto y de 28% respecto al producto purificado. - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 2

Se ha adoptado el mismo proceso que en el ejemplo 1 substituyendo la papaína por ficina. Los rendimientos han sido 2,03 x $10^6$ U.I. por kilogramo de pulmón respecto al producto bruto y de 1,64 x $10^6$ U.I. por kilogramo de pulmón respecto al producto purificado. - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 3

Cinco (5) kilogramos de pulmón picado, de buey,

000000

-4 OCT. 1974

se habían suspendido en 8 litros de agua y se habían añadido 2 litros de una suspensión que contenía 10 gramos de bromelina en un tampón fosfato (0,1 M) a un pH de 6 que contenía 1% de ácido etilendiaminotetraacético. La masa se ha calentado suavemente a 37ºC y bajo estas condiciones se ha mantenido durante 4 horas. Al final de este tiempo, la temperatura se ha elevado a 90ºC durante 10 minutos. Subsiguientemente, la masa se ha filtrado bajo presión por lavado en el filtro con 2 litros de agua destilada. El filtrado, después de enfriado, se ha tratado con bromuro de cetiltrimetilamonio hasta que se ha alcanzado la completa floculación de los polianiones, recogiéndose los últimos en un filtro a fin de separar la heparina. El filtrado claro ha dado 16 litros con una actividad de 540 U.I. por centímetro cúbico lo que corresponde a un rendimiento de 1,735 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano de partida. La purificación ha tenido lugar entonces como se ha descrito en el ejemplo 1. El rendimiento final del producto purificado ha sido de 1,18 x $10^6$ U.I. por kilogramo de pulmón. Un ensayo de comparación, realizado por extracción y fraccionación con sulfato amónico, como se revela en la patente francesa 1 566 777, ha dado un rendimiento final de producto purificado de 0,68 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano de partida, lo que corresponde a 57,7% del rendimiento obtenido con el método descrito en este ejemplo. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 4

2,5 kilogramos de pulmón en polvo seco, de buey,

se han extraído según el sistema general del ejemplo 1. El rendimiento final ha sido de 3,2 x $10^6$ U.I. por kilogramo de polvo. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 5

2,5 kilogramos de pulmón en polvo, de buey, se han suspendido en 23,5 litros de agua destilada. Con calentamiento suave hasta 40ºC se ha añadido, con agitación, una suspensión de 40 gramos de pancreatina en 4 litros de tampón de trietanolamina 0,2 M a un pH de 8, que contenía 30 gramos de cloruro cálcico. La temperatura se ha mantenido a 40ºC durante 24 horas y se ha elevado entonces a 90ºC después de lo cual la masa se ha filtrado bajo presión. El filtrado se ha tratado entonces como se revela en el ejemplo 1. El rendimiento final ha sido 4,2 x $10^6$ U.I. por kilogramo de polvo de pulmón respecto al producto bruto y de 2,8 x $10^6$ U.I. por kilogramo de pulmón respecto al producto purificado. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 6

Diez (10) kilogramos de pulmón, de buey, se han suspendido en 16 litros de agua bidestilada. Con un suave calentamiento a 40ºC se han añadido 500 gramos de páncreas fresco de buey, picados y suspendidos en 4 litros de tampón de trietanolamina 0,2 M a un pH de 8, que contenían 30 gramos de cloruro cálcico. - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Entonces el proceso ha sido como se ha revelado

en el ejemplo 5. El rendimiento final ha sido de 1,25 x $10^6$ U.I. por kilogramo de órgano respecto al producto bruto y de 0,780 x $10^6$ por kilogramo de órgano respecto al producto purificado. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

EJEMPLO 7

Veinte (20) litros de extracto de líquido de pulmón, como residuo de la separación de heparina por bases amónicas cuaternarias, se acidulan con ácido tricloroacético hasta una concentración final de 3%. Después de 60 minutos la masa se filtra bajo presión y se lava en un filtro con 5 litros de ácido tricloroacético al 3%. Se han obtenido así 23,2 litros de un líquido claro que contiene 352 U.I. por centímetro cúbico. El líquido se fracciona ahora por tratamiento con sulfato amónico, entre 0,45 y 0,9 de saturación, y el precipitado se recoge por centrifugación. Se obtienen así 41 gramos de precipitado que tiene una actividad total de 7,9 x $10^6$ U.I. y un contenido de substancias proteínicas de 31,5%, lo que corresponde a una actividad específica de unos 1,63 microgramos por U.I. - - - - - - - - -

Las purificaciones adicionales realizadas con este precipitado han permitido obtener una disolución apirogénica que contiene 36.000 U.I. por centímetro cúbico y un rendimiento final de 5,7 x $10^6$ U.I., esto es 70% de la actividad que se consideraba como total en el material bruto. La actividad específica era de 0,141 microgramos por U.I. -

4 OCT.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - -

REIVINDICACIONES

1.- Método para la producción de inhibidor de proteasa, heparina y otros mucopolisacáridos, por extracción de órganos de animales, tanto en su estado original como en forma de polvos y extractos, caracterizado porque los órganos de animales se someten a lisis con una o más enzimas proteolíticas que no atacan al inhibidor, la lisis se interrumpe por desproteinación y la disolución acuosa de lisato se complementa con un detergente catiónico, resultando la separación de una fracción insoluble que contiene heparina y mucopolisacáridos y de un residuo líquido acuoso que contiene el inhibidor de proteasa, siendo entonces purificados por separado la heparina y el inhibidor. - - - - - - - - - - - - - - -

2.- Método según la reivindicación 1, en particular para la producción de inhibidor de proteasa, caracterizado por las siguientes etapas: - - - - - - - - - - - - - - - - -

a) Tratamiento en una disolución acuosa de órganos de animales que contienen el inhibidor, ya sea en su estado original o en forma de polvos y extractos, con una enzima proteolítica elegida de entre las que no atacan al inhibidor, de modo que se realice la lisis del órgano de animal, acondicionándose la disolución acuosa de tratamiento de forma com-

ME

patible con las características y propiedades activas de la enzima proteolítica específica; - - - - - - - - - - - -

b) Interrupción de la lisis por desproteinación;

c) Separación del inhibidor por medio de un detergente catiónico; y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

d) Purificación del inhibidor en el grado deseado que es adecuado para el empleo final del inhibidor. - - -

3.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque los órganos de animal empleados son pulmones, parótidas, páncreas e hígado. - - - - - - - - - - - - - - - -

4.- Método según la reivindicación 1 ó 2 y 3, caracterizado porque el ataque proteolítico se realiza con una enzima que no es desactivada por el inhibidor. - - - -

5.- Método según la reivindicación 4, caracterizado porque la enzima proteolítica se elige entre papaína, ficina y bromelina. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

6.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la enzima proteolítica es pancreatina. - - -

7.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la interrupción de la lisis se efectúa con un agente desproteinante conocido en sí. - - - - - - - - - - -

mCe

100004

-4 OCT

8.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la interrupción de la lisis se realiza por medio de calor. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

9.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la separación del inhibidor respecto a la disolución acuosa después de la interrupción de la lisis se efectúa por adición de un detergente catiónico. - - - - - -

10.- Método según la reivindicación 9, caracterizado porque el detergente catiónico es una base amónica cuaternaria. - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

11.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque la base amónica cuaternaria se elige de entre bromuro de cetilpiridinio y de cetiltrimetilamonio. - - - -

12.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la purificación del inhibidor se realiza en la disolución acuosa que es un residuo de la separación, por adición del detergente catiónico, realizándose dicha purificación por acidulación con ácido tricloroacético al 2-5% y por tratamiento con sulfato amónico hasta una concentración comprendida entre 0,45 y 0,9 veces la concentración de saturación y fraccionación alcohólica y/o acetónica seguida por filtración con gel o cromatografía en gel. - - -

13.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque como fuente de enzimas proteolíticas se uti

MG

lizan órganos y tejidos que contienen dichas enzimas. - - -

14.- "METODO PARA LA PRODUCCION DE INHIBIDOR DE PROTEASA, HEPARINA Y OTROS MUCOPOLISACARIDOS". - - - - - - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de diecisiete hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 4 OCT. 1974

P. A. M. CURELL SUÑOL

maf/mdv.