

Mandant Nattermann
& Cie Gmbh.
11A-45 914
EX-DT

2548401

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

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

A. NATTERMANN & CIE. GMBH.

entidad alemana, domiciliada en
Nattermannallee 1, 5 Köln 30, República
Federal de Alemania, relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION DE UN
PREPARADO ENZIMATICO RICO EN LIPASA"

=====

Inventores: Hans Betzing y Dac Lekim

Prioridades: Solicitudes de patente en República
Federal de Alemania nos. P 24 08 379.2
y P 25 05 887.1, de fechas 21 febrero
1974 y 30 enero 1975, respectivamente.

Int. Cl.: CO7G 7 02G
CO7G 7102G

MEMORIA DESCRIPTIVA

Hace tiempo que se conoce el procedimiento de utilizar preparados pancreáticos con contenido de lipasa para el desdoblamiento fermentativo de grasas. Numerosas publicaciones describen el enriquecimiento de la lipasa en los preparados enzimáticos de esta clase. Los mismos se utilizan, entre otras cosas, en el tratamiento de trastornos digestivos y sus secuelas, cuyas causas estriban en primer lugar en una secreción insuficiente del páncreas o en una producción insuficiente de las enzimas correspondientes. - - - -

5.

10.

Los preparados enzimáticos que se encuentran hasta ahora en el mercado presentan por regla general actividades de lipasa de 40 a 60 unidades de Willstätter (WE) /g. Una WE es aquella cantidad de enzimas que bajo condiciones determinadas efectúa en una hora el desdoblamiento del 24% del aceite contenido en 2,5 g de aceite de oliva. Sin embargo, los valores de actividad de estos preparados son muy frecuentemente insatisfactorios según la experiencia médica para su utilización terapéutica en el ser humano, debido a que con las dosificaciones corrientes de estos preparados no puede compensarse la falta de lipasa. - - - - -

15.

20.

Por la patente británica 1 328 202 es conocido ya

- un procedimiento para la fabricación de un preparado de pan
creatina con una actividad superior a 3 x NF, entendiéndose
por NF la actividad mínima de la pancreatina de estos prepa
rados frente al almidón y a la caseína, publicada según el
5. National Formulary, XIIth Edition, por la Sociedad Farmacéu
tica Americana, Washington, D.C., Estados Unidos. En este
procedimiento, los páncreas desmenuzados se someten primero
a una autólisis en un medio acuoso alcalino a una temperatu
ra de 20 - 30°C antes de la deshidratación y del desengrasa
do con alcohol propílico y alcohol butílico, respectivamen
te. Sin embargo, el preparado enzimático obtenido después
del desengrasado del material de tejido autólizado todavía
seguía presentando una actividad de lipasa relativamente re
ducida. - - - - -
- 10.
15. Se ha descubierto ahora sorprendentemente que
cuando se efectúa la autólisis a temperaturas bajas después
de un desengrasado y deshidratación parciales del material
desmenuzado de los páncreas y la extracción subsiguiente
del material se consigue un fuerte enriquecimiento de la ac
tividad, particularmente también de la lipasa en el mate
rial del extracto. Esto era inesperado, ya que en el proce
dimiento según la patente británica podía aumentarse desde
luego substancialmente la actividad de la amilasa mediante
la etapa de autólisis, pero no la actividad de la lipasa. -
- 20.
25. Según la invención, el procedimiento para la fa
bricación de un preparado enzimático rico en lipasa estriba
en que se trata tejido pancreático desmenuzado con una mez-

5. cla de 9 partes en volumen de cloroformo y una parte de butanol, se deja reposar a continuación a 0 - 4°C durante 24 hasta 96 horas el tejido parcialmente desengrasado, se desengrasa y se deshidrata luego mediante tratamiento con acetona, y se extrae después con una solución acuosa de etanol al 5%, se mezcla después el extracto con acetona y se aísla y seca el precipitado obtenido. - - - - -

10. En general se procede a la ejecución del procedimiento según la invención de tal manera que se desmenuza tejido pancreático congelado directamente antes de la descongelación primero con una mezcla de 9 : 1 de cloroformo y butanol en una picadora de carne o en una batidora, después de extraer el disolvente orgánico se trata el tejido de nuevo con la misma mezcla de disolvente mediante agitación y se decanta nuevamente el disolvente, a continuación de lo cual se deja reposar el residuo todavía húmedo para llevar a cabo la autólisis por lo menos 24 horas, preferentemente 48 horas, en la nevera a 0 - 4°C. - - - - -

20. Después de la autólisis, el material de tejidos ya ampliamente desengrasado se remueve todavía dos veces con acetona y se separa entonces cada vez el disolvente. Para aislar el material enzimático rico en lipasa, el polvo seco de los tejidos se remueve entonces repetidamente con una mezcla de agua y etanol (proporción de volumen 95 : 5), se reúnen las soluciones separadas del tejido, y mediante 25. el adicionamiento de acetona y el centrifugado subsiguiente de la suspensión obtenido se separa el precipitado, el cual

se trata entonces con acetona y se seca seguidamente bajo va
cío. El preparado obtenido es un polvo fino de color gris
blancuzco con una actividad extraordinariamente elevada de li
pasa. - - - - -

5. Debido a que en los extractos de agua y alcohol ob-
tenidos la enzima ya se encuentra existente en los mismos con
un elevado grado de pureza, estos extractos alcohólicos al 5%
pueden utilizarse también directamente para la obtención del
preparado de lipasa, según una ejecución del procedimiento, so
10. metiendo los extractos reunidos a la liofilización. Entonces
el preparado enzimático rico en lipasa se obtiene en forma de
polvo seco de color gris blancuzco. La ventaja de esta modifi-
cación del procedimiento está basada en que se prescinde de
la separación del preparado enzimático por precipitación me-
15. diante acetona, así como del aislamiento del precipitado obte-
nido mediante filtrado o centrifugación. Ello representa tam-
bién, además de un gran ahorro de tiempo, un ahorro de gran-
des cantidades de acetona, cuya recuperación resulta de todos
modos difícil a causa del contenido de agua. La actividad del
20. preparado de lipasa obtenido de este modo equivale a la de la
enzima obtenida por precipitación mediante acetona. - - - - -

Ejemplo 1

25. De 5,0 Kg de páncreas congelado de cerdo se quita
después de la descongelación la grasa adherida, se desmenuzan
de manera basta y se homogenizan con 5 litros de una mezcla
de cloroformo y butanol 9 : 1 en un aparato batidor o en una

- picadora de carne. La pasta orgánica que se ha obtenido se re
mueve durante 30 minutos a la temperatura ambiente interior,
se separa mediante decantación la fase líquida con contenido
de cloroformo y el residuo se remueve entonces todavía 2 ve-
5. ces, cada vez con 5 litros de cloroformo y butanol 9 : 1 du-
rante 30 minutos a la temperatura ambiente interior, y cada
vez se separa el disolvente mediante decantación. Luego se de
ja reposar el residuo todavía húmedo durante 48 horas a 0 -
4°C. A continuación, el órgano ampliamente desengrasado de es
10. te modo se remueve todavía dos veces durante 15 minutos con
2,5 litros de acetona en cada una de estas dos operaciones y
cada vez se separa mediante decantación la solución excedente.

- Para la extracción de los fermentos ricos en lipasa
el material completamente desengrasado se remueve dos veces
15. durante 30 minutos con 2 litros de una mezcla de agua y eta-
nol 95 : 5 cada vez, y a continuación se separa la solución
mediante filtrado. Los extractos individuales de agua y eta-
nol se reúnen y se remueven para precipitar los fermentos pan
creáticos con 5 litros de acetona durante 15 minutos a la tem
20. peratura ambiente interior. Después de la centrifugación se
efectúa por tres veces un lavado posterior del precipitado
con 1,6 litro de acetona cada vez, se seca luego bajo vacío
y se desmenuza. - - - - -

- Rendimiento: 450 g (9% en relación con el órgano
25. húmedo) de un polvo amarillento con una actividad de lipasa
de 270 WE/g. - - - - -

Ejemplo 2

2 Kg de páncreas liofilizado de cerdo se extraen tres veces durante 30 minutos con 5 litros de cloroformo y butanol 9 : 1 cada vez mediante agitación, y cada vez se separan mediante decantación del disolvente. El residuo húmedo se deja reposar entonces durante 60 horas a 0 - 4°C. Para completar el desengrasado se remueve todavía 2 veces durante 15 minutos cada vez con 2,5 litros de acetona en cada operación, y cada vez se efectúa la separación del disolvente mediante filtraje. - - - - -

5.

10.

Para la extracción de los fermentos pancreáticos, el residuo orgánico desengrasado se trata durante 30 minutos mediante agitación dos veces con 2 litros de una mezcla de agua y etanol 95 : 5 cada vez, separándose cada vez la solución del residuo mediante filtraje. Los extractos reunidos de agua y etanol se remueven con 5 litros de acetona durante 15 minutos a la temperatura de ambiente interior, separándose mediante centrifugación los fermentos precipitados ricos en lipasa. El precipitado se lava todavía tres veces con 1,6 litros de acetona cada vez, se seca bajo vacío y se desmenuza a continuación. - - - - -

15.

20.

Ejemplo 3

3 Kg de páncreas congelado de cerdo se desmenuzan muy finamente en una picadora de carne y se homogenizan con 3,0 litros de una mezcla de cloroformo y butanol 9:1 v/v en

25.

- un aparato mezclador. La pasta orgánica correspondiente se re mueve durante 30 minutos a la temperatura ambiente interior, se separa la fase líquida con contenido de cloroformo y el re siduo se remueve entonces todavía 2 veces con 3,0 litros de
5. cloroformo y butanol 9:1 v/v cada vez durante 30 minutos a la temperatura ambiente interior, y cada vez se separa el disol vente. Luego se deja reposar el residuo todavía húmedo durante 48 horas a 4° C y a continuación el órgano ampliamente desengrasado se remueve todavía dos veces durante 15 minutos con
10. 1,5 litros de acetona en cada una de estas dos operaciones y cada vez se separa mediante decantación la solución excedente. - - - - -

- Para la extracción de los fermentos pancreáticos ri cos en lipasa el material completamente desengrasado se remue ve dos veces durante 30 minutos con 1,5 litros de una mezcla
15. de agua y etanol 95:5 v/v cada vez, y a continuación se separa la solución mediante filtrado a través de un filtro metálico. Los extractos reunidos de agua y etanol se introducen en un aparato de liofilización para separar el disolvente. (Espesor
20. de capa 1 - 2 cm aproximadamente, temperatura inicial -20° C, presión final 10^{-4} Torr, temperatura final 20° C.) Se desmenuza y se tamiza el material poroso seco. Rendimiento: 365 g (12 % en relación con el órgano húmedo) de un polvo amarillo claro con una actividad de lipasa de 250 unidades Willstät-
25. ter/g aproximadamente, equivalentes a 110 000 unidades FIP/g.

Tal como muestra una comparación de la pancreatina

fabricada según los ejemplos de la patente británica con un producto fabricado según el procedimiento de la presente invención, se obtiene mediante la autólisis protectora según la invención, sin adición de bases o de ácidos, a saber, mediante el reposo sencillo durante por lo menos 24 horas a 0 - 4°C y con el método de preparación modificado, un preparado de pancreatina con una actividad substancialmente superior de lipasa. - - - - -

	<u>Preparado de pancreatina</u>	<u>Actividad de lipasa en WE/g</u>
10.	fabricado según el ejemplo 1 de la patente británica 1 328 202	95
15.	fabricado según el procedimiento de la presente invención	240

El hecho de que en este último caso representa un papel decisivo la temperatura a la que se desarrolla la autólisis se desprende claramente de la tabla que se detalla a continuación: - - - - -

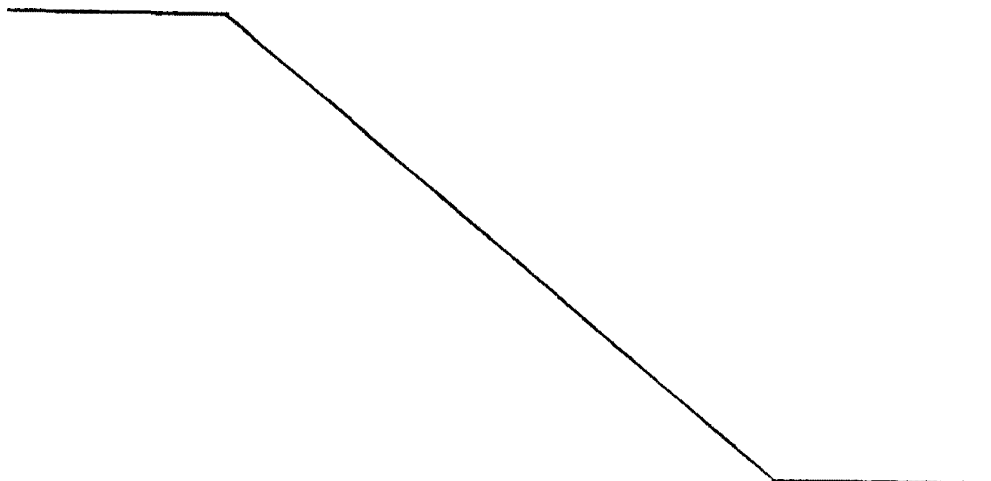


TABLA 1
Actividad

	Duración de la autólisis en horas	Autólisis a la temperatura ambiente interior	Autólisis a 0 - 42C
5.	0	100%	100%
	24	97%	110%
	48	52%	150%
	96	-	140%

La siguiente Tabla 2 muestra las actividades de lipasa determinadas según el método de Willstätter y Lazo-Wasem en unidades Willstätter y en unidades Wilson, respectivamente, de dos preparados de pancreatina del mercado en comparación con las actividades correspondientes de los productos ricos en lipasa tal como se obtienen según el procedimiento de la presente solicitud. - - - - -

10.

15.

TABLA 2

	Producto	Lipasa según Willstätter	Lipasa según Lazo-Wasem (en unidades Wilson)
	Producto de 4 NF del mercado	45 u/g	2060 u/g
20.	Producto de 5/6 NF del mercado	56 u/g	2450 u/g
	Producto según la invención	239,6 u/g	8000 u/g

En estos ensayos se determinó la actividad de lipasa según Willstätter (Hoppe-Seylers 125 (1923) 193) modificada se

25.

- gún Vogel y Laeverenz (Hoppe-Seylers 234 (1935) 176), espuman
do 2 - 3 mg del preparado pancreático en 5 ml de agua y 2 ml
de tampón de $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ con un pH de 9,2, mezclándose luego con
2 ml de cada una de las soluciones de albúmina de huevo (al
5. 2,4%), de CaCl_2 (al 1,6%), y de oleato sódico (al 1,6%), adi-
cionándose finalmente 2,5 g de aceite de oliva. La preparación
se agitó fuertemente durante algunos segundos y a continuación
se mezcló bien durante 60 minutos a 30°C mediante un agitador
magnético. A continuación se interrumpió el desdoblamiento me-
10. diante el adicionamiento de 100 ml de etanol, y después de aña-
dir 20 ml de éter y 12 gotas de solución alcohólica de timol-
ftaleína al 1% se efectuó la titración con 0,5 n de KOH alcohó-
lica hasta la tonalidad azul. Del consumo de lejía así deter-
minado se resta el consumo del ensayo en vacío, el cual se efec-
15. túa simultáneamente con el ensayo principal, con la diferencia
de que el aceite de oliva no se añade hasta después del adicio-
namiento del alcohol y éter, o sea poco antes de la titración.
De la división así obtenida del 1% de los valores se llega con
ayuda de una curva patrón empíricamente establecida a las uni-
20. dades de lipasa correspondientes, las cuales proporcionan se-
diante la multiplicación con el factor 1000/mg de porción pe-
sada las unidades Willstätter/g. - - - - -

- En la determinación de la lipasa según E.A. Lazo-
-Wasen (J. of Pharm. Sciences 50 (1961) 999), se trata aceite
25. de oliva a 37°C y con un valor pH de 7,8 mediante el adicione-
miento de hiel de ganado vacuno durante 30 minutos con el pre-
parado enzimático. Después de la acidificación se extraen con

benzol los ácidos grasos separados por desdoblamiento y se efectúa la titración con fenolftaleína como indicador. - - -

Se observa que según los dos métodos de determinación las actividades de lipasa de los preparados enzimáticos según la invención están situadas muy por encima de los valores de los productos de pancreatina que se encuentran en el mercado. Los ensayos de estabilidad han dado como resultado que las elevadas actividades de lipasa correspondientes a los nuevos preparados enzimáticos de la presente invención prácticamente no presentan ninguna variación durante un almacenamiento de muchos meses a la temperatura ambiente interior. - - -

También es de especial importancia el hecho de que los nuevos preparados de pancreatina de la presente solicitud no solamente están muy enriquecidos con enzimas lipolíticas, sino que presentan también -aunque en menor grado- un aumento de la actividad de proteasa y de amilasa en comparación con las pancreatinas corrientes en el mercado. En la Tabla 3 que sigue a continuación se han comparado nuevamente las actividades de proteasa, amilasa y esterasa de las pancreatinas según la invención con un producto de 5/6 NF en el mercado. - - -

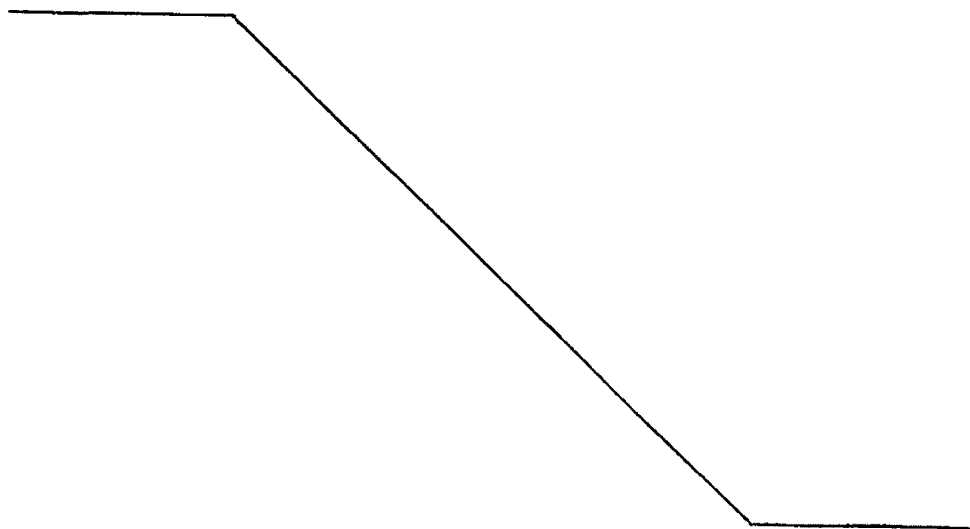


TABLA 3

Producto	Proteasa según N. Hennrich, F.I.P. J. Mond. Pharm. 1968, 3, p. 337 - 354	Amilasa según N. Hennrich, F.I.P. (hidrolisis de almidón soluble al pH de 6,8) J. Mond. Pharm. 1968, 3 p. 337 - 354	Esterasa según E.A. Lazo-Wasem y J. Melcer et al. Patente US 3.168.448 (subtrato triacetina)
Producto de 5/6 NF del mercado	1 u. ⁺	11	1500 u. Wilson/g
Preparado según la invención	1,57 - 2,16 u.	12 - 13	4800 - 6000 u. Wilson/g

⁺ determinación arbitraria: equivale a 5,04 Mol equivalentes de tirosina liberada mediante 80 % de pancreatina a un pH de 7,5

De ello se desprende que mediante el procedimiento según la invención ha resultado especialmente enriquecida la actividad de lipasa. - - - - -

N O T A

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

R E I V I N D I C A C I O N E S

10. 1.- Procedimiento para la fabricación de un preparado enzimático rico en lipasa, mediante el desmenuzamiento de tejido pancreático, autólisis, desengrasado y extracción acuosa del tejido, así como separación de la enzima del extracto acuoso por precipitación mediante acetona, y secado del precipitado

5. pitado, caracterizado porque el tejido pancreático desmenuzado se trata primero con una mezcla de 9 partes en volumen de cloroformo y 1 parte en volumen de butanol, se deja reposar a continuación a 0 hasta 4°C durante 24 - 96 horas el material de tejido que ha sido parcialmente desengrasado de esta manera, se desengrasa y se deshidrata luego con acetona, y se extrae después con solución acuosa de etanol al 5%, obteniéndose del extracto el preparado enzimático seco. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el tejido parcialmente desengrasado se deja reposar durante 48 horas. - - - - -

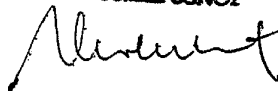
15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el preparado enzimático seco se obtiene del extracto con contenido alcohólico mediante la precipitación con acetona o directamente mediante la liofilización del extracto. - - - - -

4.- "PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION DE UN PREPARADO ENZIMATICO RICO EN LIPASA". - - - - -

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

MADRID, 19 FEB. 1975

P. A. AL CURSIL SUÑOL



maf/mpg