



ESPAÑA

(19) ES	(21) NUMERO 440.244	(20) A 1
(22) FECHA DE PRESENTACION 14.8.75		

P.- 60.500

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
71 34.435	24.9.71	Francia
72 23.868	30.6.72	"
72 23.867	30.6.72	"
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	B01D, C07G	406.980
(64) TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO DE PURIFICACION DE UNA SOLUCION DE UROQUINASA MEZCLADA CON PROTEINAS EXTRAÑAS Y SUSTANCIAS PIROGENAS"		
(71) SOLICITANTE (S)		
CHOAY S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
48, Avenue Théophile Gautier, 75 - París (16ème), Francia		
(72) INVENTOR (ES)		
Edmond Guy Vairel, Jean Goulay y Jean Choay		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

La invención se refiere a un procedimiento de obtención y de purificación de sustancias biológicamente activas, y concierne más particularmente, porque es en este caso en que su aplicación parece presentar el
5 máximo interés, pero no exclusivamente, a un procedimiento de obtención y de purificación de uroquinasas contenidas en medios biológicos, especialmente en orina de origen animal o, más particularmente aún, humana.

Concierne igualmente a un procedimiento de despirogenación (es decir, de eliminación de las sustancias
10 pirógenas) de estas sustancias biológicamente activas, más particularmente, de la uroquinasa.

Se refiere, finalmente, a un procedimiento de estabilización de sustancias biológicas, especialmente
15 de la uroquinasa, a los productos, más particularmente a los complejos de la uroquinasa que puedan obtenerse, especialmente por la aplicación de este procedimiento, así como a las composiciones y medicamentos en los cuales entran los complejos del género en cuestión.

20 Se sabe que la uroquinasa es una enzima presente en la orina y que cataliza la transformación del plasminógeno en plasmina, peptidasa cuyo papel fisiológico es el de disolver las formaciones fibrinosas intravasculares. Un defecto en los mecanismos de activación del plasminógeno, en
25 caso de cinética acelerada del sistema de coagulación o de

alteración de las paredes vasculares, conduce al mantenimiento de fibrina intravascular que en definitiva determina los diversos síndromes trombo-embólicos (trombosis, embolias, coagulación intravascular diseminada, etc.). La administración de uroquinasa en estos casos patológicos provoca una aceleración de la formación de plasmina, especialmente al nivel de las formaciones fibrinosas, como lo indica la bibliografía.

La uroquinasa constituye, pues, el tratamiento selecto de los síndromes trombo-embólicos, y su origen humano descarta los peligros de choques anafilácticos.

Ya se ha propuesto un cierto número de procedimientos de obtención de preparaciones purificadas de uroquinasa, procedimientos que implican sin embargo, en general, mermas elevadas de rendimiento en uroquinasa. Ciertas mermas de rendimiento pueden ser, por consiguiente, tanto más lamentables cuanto que los costos de producción de una uroquinasa purificada son considerables y que, en el caso de la uroquinasa extraída de la orina humana, el acopio de ésta en grandes cantidades es difícil.

Además, los procedimientos de purificación conocidos no permiten, en general, la obtención de preparaciones de uroquinasa cuyo contenido en sustancias pirógenas sea suficientemente reducido para que su utilización en terapéutica sea fácil. En efecto, este contenido en sus-

tancias pirógenas ha de representar por naturaleza un inconveniente que puede llegar a ser mayor si se tiene en cuenta la extrema sensibilidad que se observa frecuentemente en los enfermos que dependen de un tratamiento a base de uroquinasa, tratamiento que implica la administración por vía intravenosa de dosis de uroquinasa que pueden ser elevadas, que pueden llegar, por ejemplo, a 150.000 unidades CTA³⁸ o más en una sola inyección.

Finalmente, otro inconveniente reside en la dificultad de obtener preparaciones de uroquinasa de gran estabilidad, lo que complica los problemas de almacenamiento lo mismo que los relativos a la administración de estas preparaciones a los pacientes.

Se observará en particular que esta administración, que se hace en general por perfusión venosa continua de preparaciones de uroquinasa diluídas especialmente en suero glucosado, se torna delicada por el hecho de la inestabilidad de la enzima, lo que obliga a renovar muy frecuentemente la disolución o a proceder a inyecciones discontinuas de una disolución concentrada en uroquinasa en la boca de empalme del tubo de una perfusión de suero glucosado, cuando esta perfusión está introducida en su sitio.

³⁸ Unidades normalizadas de actividad en uroquinasa adoptadas por el "Committee on Thrombolytic Agents, National Heart Institute" (EE.UU.)

La invención tiene por objeto el remediar todos estos inconvenientes. De manera más particular, una finalidad de la invención es proporcionar un procedimiento de preparación y/o de purificación que permita la producción de preparaciones concentradas de uroquinasa que contienen 5 prácticamente la totalidad de la actividad en uroquinasa del medio inicial al cual se aplica el procedimiento del género en cuestión.

Otra finalidad de la invención es proporcionar un procedimiento que permita separar de las sustancias biológicamente activas, especialmente de la uroquinasa, las 10 sustancias pirógenas que las acompañan, al menos en un grado suficiente para que las sustancias biológicamente activas consideradas sean prácticamente apirógenas en dosis elevadas. 15

Otra finalidad más de la invención es proporcionar una preparación estabilizada en actividad de uroquinasa, que sea fácilmente almacenable y cuya administración a los 20 pacientes pueda realizarse por perfusión simple de una disolución de esta preparación, y esto durante muchas horas.

En una de sus variantes, el procedimiento según la invención para obtener una preparación enriquecida en uroquinasa a partir de una disolución concentrada de uroquinasa 25 bruta obtenida de manera continua de por sí, especialmente a partir de una orina humana, comprende una u otra de las

etapas siguientes, siguiendo la segunda, con preferencia, inmediatamente a la primera:

5 la primera etapa que comprende una cromatografía de exclusión por puesta en contacto de la susodicha disolución concentrada de uroquinasa bruta con una resina de dietilaminoetilcelulosa, conocida por la designación de DEAE-celulosa, estando caracterizada esta primera etapa por el hecho de que se regula previamente la conductividad de la susodicha disolución a un valor comprendido entre unos 15.000
10 y unos 25.000 micromhos por centímetro, y su pH a un valor comprendido entre 4 aproximadamente y 6 aproximadamente, con preferencia igual a 4,5, y por el hecho de que se recoge el efluente, y, con preferencia, de que se lava la resina con una disolución de sulfato amónico de pH 4,5 y cuya
15 conductividad es del orden de 15.000 micromhos por centímetro;

la segunda etapa, la cual se realiza preferentemente sobre una disolución inicial resultante de la reunión del efluente y de las aguas de lavado obtenidos a la salida
20 de dicha primera etapa, que comprende una segunda cromatografía de exclusión por puesta en contacto de esta disolución con una resina de dietilaminoetilcelulosa, estando caracterizada esta segunda etapa por el hecho de que, previamente a esta puesta en contacto, por una parte la conductividad
25 de esta disolución se regula a un valor por lo menos igual

a 15.000 micromhos por centímetro, preferentemente comprendida entre 15.000 y 18.000 micromhos por centímetro, y su pH, a un valor comprendido entre 6 y 7, preferentemente comprendido entre 6,6 y 6,8, y, por otra parte, el peso de resina utilizada en esta segunda cromatografía de exclusión se ajusta, con respecto a la actividad en uroquinasa de la disolución, a un valor suficientemente elevado para que se pueda observar una retención de proteínas sobre la resina en las condiciones de conductividad y de pH arriba indicadas, sin que este valor rebase, no obstante, aquél para el cual se observaría también una retención no despreciable de uroquinasa sobre la resina; y, finalmente, por el hecho de que la conductividad de la disolución en contacto con la resina se lleva, durante dicha segunda cromatografía de exclusión, por etapas sucesivas, por adición de agua destilada apirógena, hasta un valor final del orden de 9.000 micromhos por centímetro.

De manera ventajosa, cada adición de agua es tal que produce el descenso de la conductividad del medio en un valor del orden de 1.000 micromhos por centímetro, estando separada cada adición por una operación de agitación durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos, preferentemente del orden de 10 minutos.

Todas las operaciones que preceden se realizan, preferentemente, a una temperatura del orden de 42°C.

Se observará que la invención ha propuesto así condiciones en las cuales se ayuda a una adsorción preferencial de las impurezas proteínicas contenidas en la disolución concentrada en uroquinasa, sin que esta última sea retenida por la resina. El parámetro principal que interviene en el establecimiento de estas condiciones de adsorciones diferenciales está constituido por la conductividad de las disoluciones tratadas.

La observancia de los márgenes de conductividad, en las condiciones de pH indicadas anteriormente, es esencial para una buena marcha del procedimiento según la invención y para la obtención de rendimientos elevados en uroquinasa. Se observará en particular que, en el caso de la primera cromatografía de exclusión, la resina no puede fijar ni uroquinasa, ni impurezas proteínicas si la conductividad inicial de la disolución concentrada en uroquinasa es superior a 25.000 micromhos por centímetro. Por el contrario, adsorbe a la vez la uroquinasa y las impurezas proteínicas si la conductividad de la disolución concentrada en uroquinasa está regulada a un valor inferior a 10.000 micromhos por centímetro.

Sucede lo propio a nivel de la segunda cromatografía de exclusión. Para las conductividades iniciales de 15.000 a 18.000 micromhos por centímetro de la disolución tratada se observa una adsorción muy selectiva de las proteínas. Cada una de las diluciones sucesivas da por resul-

tado una adsorción suplementaria de proteínas sobre la resina. La saturación progresiva de ésta ocasiona una disminución de su afinidad para la uroquinasa, de manera que las diluciones sucesivas susodichas pueden elevarse hasta el valor
5 de 9.000 micromhos por centímetro, sin que resulte de ello un riesgo de adsorber igualmente la uroquinasa.

Asimismo es importante, sobre todo en la segunda cromatografía de exclusión, mantener entre ciertos límites los valores de la razón entre la cantidad de resina empleada y la actividad en uroquinasa de la disolución tratada.
10

Esta razón puede variar entre límites bastante amplios en la primera cromatografía de exclusión. Se ha observado particularmente que se obtenían resultados semejantes para todos los valores de esta razón comprendidos entre
15 15 g y 40 g, aproximadamente, de resina seca por 14 millones de unidades CTA en uroquinasa.

La selección de esta razón es más crítica en el caso de la segunda cromatografía de exclusión. Deberá mantenerse, especialmente para valores de la conductividad
20 situados en torno a 22.000 micromhos por centímetro, entre unos 30 y unos 60 g de resina seca por 10 millones de unidades de CTA en uroquinasa de la disolución a tratar, obteniéndose los mejores resultados para valores comprendidos entre 40 y 53 g de resina seca por 10 millones de unidades
25 CTA en uroquinasa.

Se puede, en ciertos casos, someter directamente la disolución concentrada en uroquinasa a la segunda cromatografía de exclusión mencionada anteriormente, sobre todo en el caso en que se recurriese, en las etapas de purificación final, a etapas especiales, ulteriores, de separación de las sustancias pirógenas que, en las orinas humanas, acompañan siempre a la uroquinasa. En la práctica es, sin embargo, lo más frecuentemente preferible el hacerla preceder por la primera cromatografía de exclusión mencionada anteriormente. Esta permite, en efecto, además de una primera eliminación de una pequeña cantidad de impurezas proteínicas, la obtención de una disolución perfectamente clara y una primera despirogenación de la uroquinasa.

El procedimiento según la invención permite un enriquecimiento importante de la uroquinasa respecto de las proteínas que la acompañaban inicialmente, siendo eliminadas de 50 a 60% de las proteínas, con un rendimiento total en actividad de uroquinasa. Se observó especialmente que la disolución obtenida al término de la primera cromatografía de exclusión contiene el mismo número de unidades de uroquinasa que la disolución inicial. El número de unidades de uroquinasa recogidas al término de la segunda cromatografía de exclusión es incluso ligeramente superior al de la disolución sometida a esta segunda cromatografía de exclusión, lo que puede interpretarse eventualmente, por la adsorción

sobre la resina de un inhibidor de la uroquinasa. Este rendimiento total en actividad de uroquinasa constituye, por consiguiente, una ventaja decisiva del procedimiento según la invención sobre todo si se tienen en cuenta, por una parte, las dificultades que se encuentran para reunir orinas humanas en grandes cantidades y, por otra parte, los costos considerables de producción de una uroquinasa purificada.

Se puede purificar aún más la disolución así enriquecida en uroquinasa recurriendo a tratamientos suplementarios en principio conocidos, especialmente por adsorción de la disolución sobre caolín, después por cromatografía de adsorción sobre resina del tipo Amberlite o incluso por cromatografía de adsorción sobre carboximetilcelulosa.

El procedimiento según la invención, completado por una de las técnicas que acaban de ser recordadas y aplicado a una disolución de uroquinasa bruta extraída de la orina humana, permite finalmente la eliminación de 80-90% de las proteínas que acompañan inicialmente a la uroquinasa, sin pérdidas notables en actividad de uroquinasa.

La disolución concentrada de uroquinasa bruta empleada inicialmente puede obtenerse de todas las formas de por sí conocidas, por ejemplo, en el caso de la extracción de la uroquinasa a partir de disoluciones muy diluidas, tales como los orines, especialmente humanos, por puesta en

contacto de éstos con un agente de adsorción de las proteínas y por elución del producto absorbido. Se han descrito en la bibliografía diversos procedimientos que permiten producir disoluciones iniciales concentradas en uroquinasa bruta, empleándose en estos procedimientos agentes de adsorción tan diversos como, por ejemplo, gel de sílice, silicatos cambiadores de cationes, sales tales como el sulfato de bario, resinas tales como la oxixelulosa, etc.

5

De manera ventajosa, se recurrirá a un puesta en contacto de estas disoluciones con un coadyuvante de filtración tal como el comercializado con la marca

10

"Hyflosupercel", siendo seguida esta operación de una reextracción de la uroquinasa y de las proteínas adsorbidas por el coadyuvante de filtración, de un aumento de la uroquinasa contenida en la disolución de extracción mediante sulfato amónico, de una disolución del precipitado obtenido en una disolución glucosada y de diálisis de ésta para obtener finalmente un líquido dializado que se somete a una de las etapas de cromatografía de exclusión, con preferencia a la primera, del procedimiento según la invención.

15

20

El procedimiento según la invención permite, pues, la obtención de preparaciones concentradas de uroquinasa que presentan ya un gran grado de pureza y un contenido reducido en sustancias pirógenas, prestándose ya estas preparaciones muy eficazmente a tratamientos en clínica

25

humana. Este contenido en sustancias pirógenas no es, sin embargo, todavía despreciable. En efecto, las preparaciones purificadas de uroquinasa obtenidas por el procedimiento según la invención producen aún una cierta hipertermia en el conejo cuando las dosis administradas sobrepasan un umbral moderadamente elevado. Inyectadas a conejos en las condiciones conformes a los métodos generales de análisis de la Pharmacopée Française, 8ª edición, página 1615, a razón de 3.000 unidades CTA/kg. estas preparaciones purificadas de la uroquinasa producen una elevación de temperatura que varía de 0,5 a 0,920 de un conejo a otro.

A fin de obtener preparaciones de uroquinasa que tengan contenidos aún más reducidos en sustancias pirógenas se recurre al procedimiento, según la invención, de purificación, más particularmente de despirogenación, de sustancias proteicas de actividad biológica, especialmente de uroquinasa, las cuales han soportado preferentemente una primera purificación, estando caracterizado este procedimiento por el hecho de que se produce una saturación parcial de esta disolución con un agente de precipitación de las proteínas hasta un grado, función de la concentración inicial de la disolución en proteínas, tal que esta saturación parcial sólo induce la precipitación de una parte de las proteínas contenidas en la disolución inicial, siendo esta parte lo suficientemente reducida para que su con-

tenido en la sustancia proteica de actividad biológica sea mantenido en proporciones pequeñas predeterminadas, si no prácticamente despreciables, y de que se recoge la capa que sobrenada.

5

En un modo de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, aplicado a la uroquinasa, el agente de precipitación está constituido por sulfato amónico, siendo verificada la susodicha precipitación parcial sobre, una disolución de uroquinasa que contiene de 1,5 a 3 mg. de proteínas por ml, a pH comprendido entre 3 y 4,5 preferentemente del orden de 3,8, habiendo sido regulada previamente la conductividad de esta disolución a un valor comprendido entre 15.000 y 25.000 micromhos por centímetro, no siendo ascendido el grado de saturación de la disolución en sulfato amónico, comprendido entre 0,25 y 0,35, por encima de éste que produce una precipitación de proteínas que arrastra más del 53 de la actividad en uroquinasa contenida en la disolución inicial (entendiéndose que el grado de saturación de la disolución es igual a 1, cuando la disolución está saturada completamente, es decir, por disolución de 700 g de sulfato amónico en 1.000 ml de agua destilada a +42C). La uroquinasa prácticamente exenta de sustancias pirógenas contenida en la capa que sobrenada puede ser aislada entonces, especialmente por saladura de la disolución con sulfato amónico cristalizado.

10

15

20

25

Se apreciará que, habida cuenta de los márgenes de concentraciones en proteínas preferidos, indicados anteriormente, se tendrá interés en proceder a una purificación previa, tan avanzada como sea posible, de las uroquinasas a tratar, para eliminar el máximo posible de proteínas, para que no sea necesario actuar sobre volúmenes demasiado grandes de disolución. En otras palabras, el procedimiento según la invención constituye, en una de sus aplicaciones preferidas, una etapa de purificación final destinada a perfeccionar los efectos de un procedimiento de purificación previa.

De manera ventajosa, se recurrirá al procedimiento de purificación según la invención descrito más arriba, que comprende las dos etapas de cromatografía de exclusión indicadas anteriormente, completadas por una tercera etapa que comprende:

bien una cromatografía de adsorción sobre carboximetilcelulosa de la uroquinasa contenida en la disolución resultante de la reunión de efluente y de las aguas de lavado de la resina de la segunda cromatografía de exclusión, a pH del orden de 5, y la elución de la uroquinasa adsorbida sobre la carboximetilcelulosa con un tampón de fosfato a pH 6,8-6,9.

bien una adsorción de la disolución resultante de la reunión del efluente y de las aguas de lavado, de

la segunda cromatografía de exclusión sobre caolín a pH 6,2, la elución de la uroquinasa retenida sobre el caolín por una disolución de cloruro amónico en amoníaco del 4%, una precipitación con sulfato amónico, volver a disolver el precipitado en agua y una diálisis de la suspensión contra una disolución de fosfato 0,05 M tamponada a pH 6,2, una filtración del líquido dializado sobre una columna de resina del tipo Amberlite IRC 50, y una elución de la resina para recuperar la uroquinasa.

Se ha comprobado, como ya se indicó anteriormente, que el grado de saturación de la disolución en sulfato amónico que produce la formación de un precipitado de proteínas (entre ellas las sustancias pirógenas) que retiene un porcentaje mínimo dado de uroquinasa, varía en función, especialmente inversa, del contenido inicial en proteínas de la disolución tratada.

Los valores que conviene dar a este grado de saturación, habida cuenta del contenido inicial de la disolución en proteínas, se deducen particularmente de la gráfica de la figura única del dibujo adjunto. Estos valores han sido determinados experimentalmente, especialmente sobre disoluciones purificadas según el procedimiento preferido de purificación indicado posteriormente, en particular sobre aquéllas obtenidas en los ejemplos descritos más adelante. El eje A de la figura única está graduado en concentracio-

nes de proteínas (en mg/ml) de las disoluciones a tratar, el eje C, en grados de saturación (23) de la disolución en sulfato amónico, y el eje B, en % de uroquinasa arrastrada en el precipitado de proteínas formado en las condiciones de la invención. Las disposiciones relativas de estos ejes y las escalas de sus graduaciones han sido seleccionadas de tal manera que el porcentaje de uroquinasa arrastrada viene dado, en cada caso, por el punto de intersección con el eje B de una recta que pasa por los puntos representativos de la concentración en proteínas, sobre el eje A, y del grado de saturación en sulfato amónico sobre el eje C, respectivamente. Así se obtiene, por ejemplo, un precipitado de proteínas que retiene el 5% de la actividad en uroquinasa de la disolución inicial, llevando a 0,30 el grado de saturación en sulfato amónico de la disolución, cuando el contenido inicial en proteínas de ésta es de 2 mg/ml (recta a de trazos interrumpidos), o llevándolo a 0,25 cuando este contenido inicial es de 3mg/ml (recta b de puntos y rayas).

Considerando de manera más precisa, por ejemplo, el caso de una disolución inicial de uroquinasa que contiene 2 mg/ml de proteínas, se pueden hacer las observaciones siguientes.

Hasta un valor del grado de saturación igual a 0,20, no hay formación de precipitado. La disolución obte-

nida conserva, pues, sus sustancias pirógenas. A la misma concentración en proteínas y con un grado de saturación igual a 0,25, se inicia un ligero precipitado, reteniendo este precipitado alrededor del 2,5% de la uroquinasa contenida en el medio. Esta saturación no es suficiente para retener la totalidad de sustancias pirógenas. Por el contrario, con un grado de saturación de 0,30, el precipitado formado que contiene alrededor del 5% de la uroquinasa, retiene igualmente la mayor parte de las sustancias pirógenas. La capa que sobrenada, que contiene todavía el 95% de la actividad total de uroquinasa contenida en la disolución inicial, está exenta de sustancias pirógenas, según las normas fijadas por la Farmacopea Francesa ya mencionada, a dosis tan elevadas como de 15.000 unidades CTA/kg. A una saturación superior a 0,30, la capa que sobrenada será igualmente apirógena a las mismas dosis, pero la cantidad de uroquinasa retenida sobre el precipitado será más importante, como lo muestra la gráfica.

La invención concierne finalmente a un procedimiento de estabilización de la uroquinasa, procedimiento que consiste en hacer reaccionar una disolución de uroquinasa purificada con una disolución de heparina, preferentemente en medio ácido, a un pH comprendido entre 1 y 5, con preferencia 4,2, y en recoger el precipitado formado, especialmente por centrifugación.

La disolución de uroquinasa purificada inicial se obtiene ventajosamente por el empleo del procedimiento de enriquecimiento descrito anteriormente, completado, llegando el caso, por el procedimiento de despirogenación igualmente descrito anteriormente.

5

La invención se refiere igualmente al producto obtenido por la reacción de la disolución de uroquinasa con una disolución de heparina, producto que está constituido por un complejo de uroquinasa y heparina, complejo que, en lo sucesivo, será denominado "heparinato de uroquinasa", quedando convenido que la expresión uroquinasa abarca tanto a la uroquinasa pura como a las uroquinasas denominadas purificadas, utilizadas actualmente en terapéuticas.

10

El heparinato de uroquinasa es un complejo que se presenta en forma de agregados y cuyo peso molecular es función del peso molecular de la heparina utilizada y de las impurezas de origen proteínico que acompañan, llegando el caso, a la uroquinasa. En este complejo, la actividad en heparina es despreciable en relación a la de la uroquinasa. En efecto, la heparina, gracias a sus numerosos grupos funcionales ácidos, puede fijar numerosas moléculas de uroquinasa.

15

20

El heparinato de uroquinasa es soluble a pH 7 y precipita cuando se acidifica la disolución hasta pH 4.

25

Se puede recuperar cada uno de los constituyen-

tes del complejo destruyéndolo en un medio de NaCl/HCl. Se obtiene entonces un precipitado constituido por la uroquinasa, en tanto que la heparina pasa a disolución.

5 Se obtiene el heparinato de uroquinasa en estado seco, especialmente por liofilización de estas disoluciones. Es estable y puede conservarse tal cual sin dificultades.

10 Además de esto, el heparinato de uroquinasa, conserva íntegramente todas las propiedades, especialmente las farmacológicas y terapéuticas, de la uroquinasa, y da lugar a disoluciones estabilizadas en los medios de perfusión usuales, tales como las disoluciones de suero glucosado al 5%.

15 Todavía aparecerán características suplementarias de la invención en el curso de la descripción de los ejemplos siguientes. Queda convenido que en lo que sigue, todas las operaciones se efectúan a una temperatura del orden de 4 °C, salvo en los casos en que se estipulará expresamente un valor de temperatura diferente.

20 Ejemplo 1

a) Preparación de una uroquinasa purificada.

25 Se recogen sobre fenol mil litros de orina. La cantidad de fenol empleada a este efecto es tal que, al fin de la recogida, la concentración en fenol sea como mínimo del 0,5%. Por adición de ácido acético, se ajusta a 5,8 el

pH de la orina recogida.

2 - Adsorción de la uroquinasa contenida en la orina sobre el hyflosupercel

5 Se añaden a la mezcla 5 kg de hyflosupercel, y en una cuba de Grignard de doble cubierta enfriada a 4°C, se le somete a una agitación durante 3 horas. El polvo de hyflosupercel se recoge por filtración sobre un filtro-prensa y se obtienen 17 kg de una pasta que contiene 12 kg de agua.

10 3 - Extracción de la uroquinasa adsorbida sobre el hyflosupercel

15 Se añaden a la pasta obtenida 960 g de cloruro sódico cristalizado y 17 litros de una disolución tamponada a pH 7,2, obtenida añadiendo 10,8 g de fosfato disódico y 80 g de NaCl en 1.000 ml de agua desmineralizada. La resistividad de la disolución tampón es de 84.000 microohmios por centímetro a 15°C.

20 Después de 30 minutos de agitación, se separa el polvo de hyflosupercel de la mezcla por filtración sobre un embudo del tipo Büchner de 200 mm de diámetro, guarnecido con una tela de, por ejemplo, fibras sintéticas, como las comercializadas con la marca Tergal. Se deja sedimentar el polvo y se termina la filtración operando bajo una depresión de 500 mm de mercurio. Antes de que esté completamente seco, el polvo se lava con 10 litros de diso-

25

lución de lavado, obteniéndose un volumen de 30 litros. La actividad en uroquinasa de la disolución así obtenida es de 4 millones de unidades CTA.

4 - Precipitación de la uroquinasa contenida en la disolución tampón

5

Se ajusta el pH de la disolución a 4,2 por adición de ácido clorhídrico 5N. Se añaden 13,3 kg de sulfato amónico (450 g por litro de disolución) y se agita hasta disolución completa de la sal.

10

La mezcla se deja en reposo durante 12 horas. El precipitado que se forma se recoge por centrifugación. Se utiliza a este efecto una centrifugadora comercializada con la marca Alfa Laval, del tipo B 1424 F. Se obtienen 60 g de precipitado húmedo; se añaden al precipitado 60 ml de una disolución acuosa que contiene 18 g de glucosa por litro de agua.

15

Se dializa entonces la mezcla hasta que la conductividad de la disolución final que contiene la uroquinasa sea de 22.000 micromhos por centímetro.

20

Se activa la diálisis por agitación. La disolución dializada se clarifica por centrifugación. La actividad de la disolución obtenida es de 4.000.000 de unidades CTA de uroquinasa.

5 - Exclusión de la uroquinasa sobre DEAE-celulosa

25

a) Se añaden 7,1 g de DEAE-celulosa a la disolución clari-

ficada precedente y se lleva el pH a 4,5. Después de 30 minutos de agitación, se separa la DEAE-celulosa por filtración sobre un embudo Büchner de 150 mm de diámetro, operando bajo un vacío moderado para evitar la formación de espuma.

5

La DEAE-celulosa se lava dos veces con una disolución de sulfato amónico de 15.000 micromhos por centímetro de conductividad a pH 4,5. El volumen utilizado para cada lavado es igual al de la DEAE-celulosa y representa alrededor de 250 ml.

10

Durante la filtración de la disolución de lavado, se mantiene el balón de vacío en un baño de hielo.

La actividad del filtrado es de 4.000.000 unidades CTA.

15

b) Al filtrado obtenido, de pH 4,5, se añaden 17,2 g de DEAE-celulosa y se lleva a pH 6,7.

Se disminuye la conductividad por dilución con agua hasta 9.000 micromhos por centímetro. Después de 30 minutos de agitación, se separa la DEAE-celulosa por filtración sobre un embudo Büchner de porcelana, de 150 mm de diámetro. En el transcurso de la filtración, se lleva el pH de los líquidos filtrados o efluentes recogidos a 5 por adición de ácido sulfúrico 5 N.

20

Se lava la DEAE-celulosa con una disolución de sulfato amónico, de 9.000 micromhos por centímetro de con-

25

ductividad, a pH 7, hasta la obtención de un filtrado incoloro.

Los filtrados y las disoluciones de lavado se reunen y se ajustan a pH 5. La actividad en uroquinasa de la disolución obtenida es de 4.400.000 unidades CTA.

5
6 - Adsorción de la uroquinasa sobre caolín y separación por elución

Se prepara el caolín como sigue:

10
1 kg de caolín se lava y se pone en suspensión en 3 litros de agua destilada, Se deja la mezcla en la autoclave durante 90 minutos a 120°C.

Después de haber dejado sedimentar las materias en suspensión, el caolín se separa y luego se pone a secar al horno a 200°C.

15
La disolución obtenida en el transcurso de la última etapa, disolución que exhibe una valoración de 4.400.000 unidades CTA, se lleva a un pH de 6,8 y, después de la adición de 65 g de caolín preparado de la manera arriba indicada, a un pH 6,2. La mezcla se somete a agitación durante una hora. A continuación, el caolín se separa por centrifugación en frío y se pone en suspensión en un litro de disolución de fosfato 0,05 M tamponada a pH 6,2.

20
Después de 30 minutos de agitación, se separa el caolín por centrifugación.

25
Los 65 g de caolín se ponen en suspensión en

500 ml de una disolución que contiene 75 g de cloruro amónico por litro de amoníaco del 4%, y se agitan durante 30 minutos. El caolín, separado de la capa que sobrenada, se somete a la misma operación de elución otras dos veces.

Se reúnen las capas que sobrenadan obtenidas en el curso de las centrifugaciones y se les añade ácido sulfúrico 0,1 N para obtener un pH de 3,5.

Reuniendo las capas que sobrenadan obtenidas en el curso de las centrifugaciones, se obtienen 1.400 ml de eluato. El pH del eluato se lleva a 3,5 por adición de ácido sulfúrico 0,1 N. Se añaden entonces 490 g de sulfato amónico (350 g por litro de eluato). El precipitado formado se recoge por centrifugación en frío y se pone en suspensión en agua. Se efectúa entonces, durante 18 horas, una diálisis frente a una disolución de fosfato 0,05 M tamponada a pH 6,2.

La actividad en uroquinasa de la disolución obtenida es de 2.800.000 unidades CTA.

7 - Filtración de la disolución dializada sobre una columna de resina

La disolución dializada se filtra sobre una columna de resina del tipo Amberlite IRC 50, de 4 cm de diámetro y de 60 cm de altura, equilibrada previamente con la disolución de fosfato 0,05 M tamponada a pH 6,2.

Una vez que ha salido de la columna el eluato, se lava la resina con la disolución tampón hasta que la adición de ácido tricloroacético al 5% no provoque más la formación de precipitado en las fracciones recogidas.

5 Para eluir la uroquinasa, se utiliza una disolución tampón de fosfato 0,2M, de pH 8,2, que contiene 75 g de cloruro amónico por litro de disolución. Se recoge en un colector de fracciones del eluato. En los cubos, que contienen la actividad, se precipita la uroquinasa con sulfato amónico a pH 3,5, a razón de 350 g de sulfato amónico
10 por litro de eluato, o sea 158 g para los 450 ml obtenidos de eluato.

b) Preparación de una uroquinasa apirógena

15 El precipitado final de la preparación a) se recoge por centrifugación, y después se disuelve en agua destilada apirógena y estéril, de manera que se obtenga una conductividad comprendida entre 15.000 y 25.000 micromhos por centímetro. La concentración en proteínas de esta disolución es del orden de 2 mg/ml.

20 Estando regulado el pH en un valor de 3,8 y comprendida la temperatura entre 0 y 4^o C, se añade a este medio una disolución saturada de sulfato amónico hasta obtener una saturación 0,3 (o sea, una disolución 1,22 M en sulfato amónico). Se agita el medio durante 15 minutos,
25 y luego se deja en reposo, igualmente durante 15 minutos.

Se recoge el precipitado por centrifugación a 10.000 g (fracción A).

5 A la capa que sobrenada se añade sulfato amónico puro, a razón de 250 g/l, a pH 3-3,5, y luego se agita durante 30 minutos. El precipitado que contiene la uroquinasa se recoge por centrifugación a 10.000 g (fracción B).

9. Resultados

10 Cada uno de estos precipitados (fracciones A y B) se pone de nuevo en suspensión en agua destilada, apirógena y estéril, el pH de la suspensión se lleva a 7, y, finalmente, se filtra la suspensión sobre membrana de 0,22 μ en medio estéril.

El filtrado que proviene de la fracción A contiene alrededor del 5% de la actividad de uroquinasa.

15 El filtrado que proviene de la fracción B contiene alrededor del 95% de la actividad de uroquinasa de la disolución inicial.

20 Resulta que la fracción A retiene prácticamente la totalidad de las sustancias pirógenas contenidas inicialmente en la disolución inicial obtenida por disolución del precipitado, obtenido con sulfato amónico, antes del fraccionamiento. La fracción B, por el contrario, está exenta de sustancias pirógenas según las normas de la farmacopea francesa, ref. cit. Estos resultados se deducen
25 de la Table I siguiente, en la cual se han indicado las

5 elevaciones de temperatura observadas respectivamente en series distintas de tres conejos para cada una de las fracciones ensayadas, y en una serie complementaria de ocho conejos para la fracción B, habiendo reducido todos estos conejos las dosis indicadas en la parte izquierda de la Tabla, en las condiciones previstas por la Farmacopea Francesa.

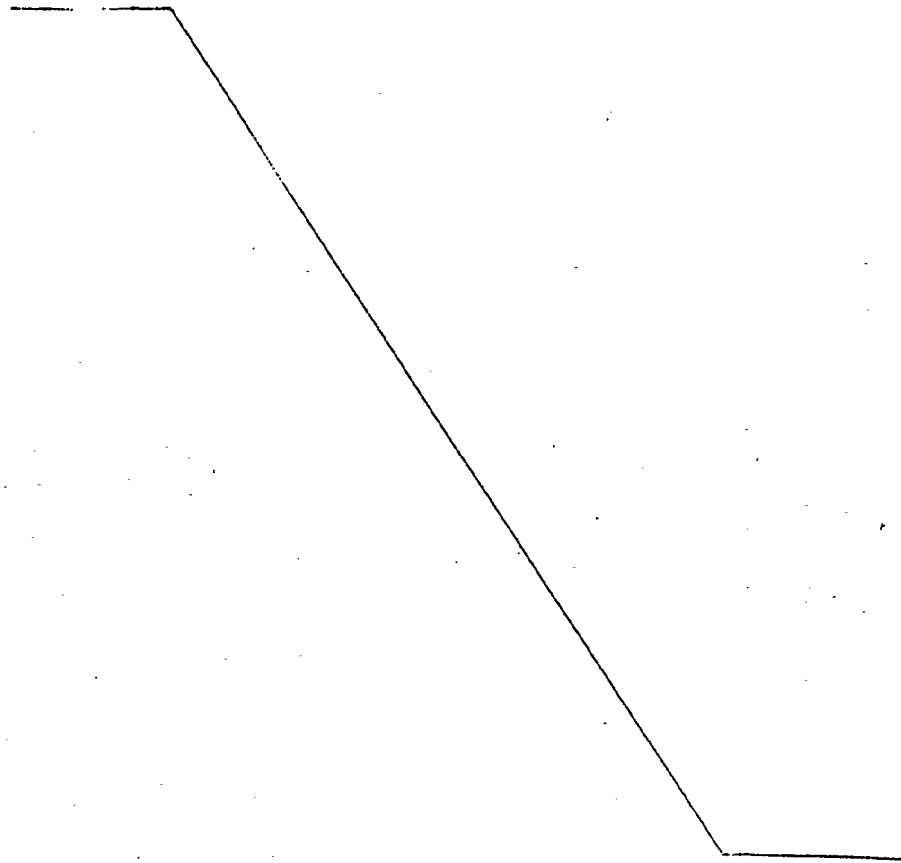


TABLA I

Disolución o fracciones ensayadas	Elevaciones de temperatura, en °C		valor medio (8 conejos)
	Series de 3 conejos	Serie de 8 conejos	
Disolución inicial: 3.000 uCTA/KE	005 008 009		007
Fracción A 3.000 uCTA/KE	009 009 10		009
Fracción B 15.000 uCTA/KE	001 002 00	00, 00, 00, 00, 001, 003, 004, 001	001

Ejemplo 2. Preparación de una uroquinasa apirógena.

a) Preparación de una uroquinasa purificada

5 Se trata como sigue un precipitado por sulfato amónico que contiene la uroquinasa bruta y obtenido en las condiciones indicadas en el párrafo 4 del ejemplo 2, a partir de una disolución a su vez obtenida a partir de orina humana, a la cual se ha aplicado el procedimiento de concentración previa según los párrafos 1 a 3 del mismo ejemplo 2.

10

A) Condiciones de primera exclusión:

15 El precipitado por sulfato amónico se disuelve en una a dos partes de agua glucosada, a razón de 18 g de glucosa por litro, y se regula el pH a un valor comprendido entre 4 y 6, y preferentemente igual a 4,5.

15

20 Se dializa la disolución obtenida frente a agua destilada hasta la obtención de una conductividad comprendida entre 30.000 micromhos por centímetro y 50.000 micromhos por centímetro, preferentemente igual a 40.000 micromhos por centímetro.

20

Se centrifuga la disolución obtenida a 3.000 g para eliminar la parte insoluble formada, constituida por impurezas no proteicas.

25

Se realiza una nueva diálisis de capa que sobrenada hasta obtención de una disolución dializada cuya con-

ductividad está comprendida entre 15.000 y 25.000 micromhos por centímetro, con preferencia igual a 22.000 micromhos por centímetro.

5 Se añade DEAE-celulosa a la disolución obtenida a razón de 25 g de resina seca o de 100 g de resina filtrada con succión, previamente equilibrada con una disolución de sulfato amónico 0,11 M de pH 4,5 (conductividad de 15.000 micromhos por centímetro a 42C), por 14 millones de unidades CTA de uroquinasa.

10 Se agita el medio durante una duración de 20 a 40 minutos, preferentemente de 30 minutos.

15 Se filtra con succión la resina, especialmente sobre un embudo Büchner bajo depresión ligera, y se lava la resina con una disolución de sulfato amónico 0,11 M, de pH 4,5, hasta obtención de un líquido efluente o filtrado incoloro.

Se reúnen el filtrado y las aguas de lavado. La actividad total en uroquinasa de la disolución obtenida es sensiblemente igual a la que ha sido tomada a la partida.

20 B) Condiciones de segunda exclusión:

La disolución anterior se lleva a un pH comprendido entre 6 y 7, con preferencia del orden de 6,6.

25 Se añaden a esta disolución 60 g de DEAE-celulosa en polvo o 250 g de DEAE-celulosa filtrada con succión, previamente equilibrada con una disolución de sulfato amó-

nico 0,068 M de pH 7 (conductividad de 9.000 micromhos por centímetro a 42C), por 14 millones de unidades CTA de uroquinasa. La conductividad del medio es entonces de 15.000 a 18.000 micromhos por centímetro.

5 Se lleva entonces la conductividad del medio a 9.000 micromhos por centímetro mediante adiciones sucesivas de agua destilada apirógena, de forma tal que cada adición produzca un descenso de conductividad del medio de 1.000 micromhos por centímetro, estando separada cada adición por
10 una agitación durante una duración de 5 a 15 minutos, preferentemente igual a 10 minutos.

Se ajusta entonces el pH del medio a 7 por adición de sosa 2 M. Después de una agitación durante una duración de 30 minutos, se filtra, especialmente sobre un
15 embudo Büchner inoxidable bajo depresión ligera, manteniéndose el recipiente receptor en un baño de hielo en fundición, se lava la resina con una disolución de sulfato amónico de 9.000 micromhos por centímetro de conductividad, 0,068 M y de pH 7 hasta obtención de un filtrado incoloro.

20 La disolución obtenida por reunión del filtrado y de las aguas de lavado puede someterse entonces a tratamientos suplementarios de purificación, especialmente a los tratamientos de adsorción sobre caolín y de cromatografía de adsorción sobre resina del tipo Amberlite en las
25 condiciones descritas en el ejemplo precedente, o incluso

de cromatografía de adsorción sobre carboximetilcelulosa en las condiciones siguientes:

b) Preparación de una uroquinasa apirógena

A) Preparación de una disolución purificada y concentrada en uroquinasa.

5

Se parte de 22.000 litros de orina humana y se procede a una extracción de la uroquinasa bruta en condiciones idénticas a las del ejemplo 3 anterior, salvo en lo que concierne a la etapa de cromatografía de adsorción sobre carboximetilcelulosa, sobre la disolución obtenida al término de la etapa de la segunda exclusión en contacto con la resina de DEAE-celulosa, realizándose esta cromatografía de adsorción como sigue:

10

15

A la disolución susodicha, llevada a pH 5, se añade carboximetilcelulosa a razón de 80 g de resina seca por 14.000.000 unidades CTA de uroquinasa, habiendo sido equilibrada previamente la carboximetilcelulosa con una disolución de sulfato amónico de 9.000 μ mos por cm. pH 5, = 0,068 N. La suspensión se mantiene en agitación moderada durante un período de 12 a 14 horas a una temperatura comprendida entre 2 y 4°C, manteniéndose su pH a 5 \pm 0,1.

20

A continuación se filtra la suspensión sobre papel de textura granulada por intermedio de un embudo Büchner de porcelana, bajo depresión ligera. Los efluentes conservan la coloración inicial.

25

Se lava entonces la carboximetilcelulosa con una disolución de sulfato amónico de 9.000 micromhos por centímetro a pH 5, y luego con un tampón de fosfato 0,05 M a pH 6,5, a fin de desplazar sulfatos, hasta obtención de una disolución incolora.

5

Después se filtra con succión la carboximetilcelulosa. Seguidamente se añade a ésta un volumen de tampón de fosfato 0,5M igual al peso de tampón 0,05 M retenido en la carboximetilcelulosa filtrada con succión, a una temperatura de 15-20° C, bajo agitación. A continuación se añade un volumen igual de un tampón de fosfato sódico 0,29 M, y luego, de un tampón de fosfato 0,5 M, para obtener una molaridad final de 0,29 M y un pH del orden de 6,8 a 6,9.

10

15

Entonces se lleva la temperatura a 6° C y se agita la suspensión durante 30 minutos, siendo filtrada con succión, seguidamente, la carboximetilcelulosa sobre papel de textura granulada (sobre un embudo Büchner), y lavada con un tampón de fosfato 0,29 M hasta obtención de una disolución clara, que no precipita con tanino.

20

Se reúnen el eluato y las aguas de lavado para formar una disolución purificada de uroquinasa, que contiene de 80 a 90% de la actividad de uroquinasa de la disolución resultante de la reunión del efluente y de las disoluciones de lavado obtenidas al término de la segunda cromatografía.

25

tografía de exclusión antedicha.

B) Despirogenación

5 La disolución purificada obtenida, que contiene 65.000.000 de unidades CTA de uroquinasa, se lleva a pH 3,5, y la uroquinasa se precipita con sulfato amónico, a razón de 350 g de sulfato amónico por litro de eluato.

Se obtienen 35 g de un precipitado que exhibe una valoración total de 65 millones de unidades CTA de uroquinasa.

10 Se disuelve este precipitado en 600 ml de agua destilada estéril, apirógena; la disolución obtenida presenta, a pH 3,8, una conductividad de 15.000 micromhos por centímetro y un contenido en proteínas de 2 mg/ml.

15 Esta disolución provoca en el ensayo pirógeno sobre el conejo una hipertermia de 0,9º C para una dosis de 3.000 unidades CTA/kg.

20 Se añaden lentamente bajo agitación 258 ml de disolución saturada de sulfato amónico, previamente llevada a pH 4 y a 4º C. Se lleva a 3,8 el pH del medio, se agita durante 15 minutos, y luego se deja en reposo durante 15 minutos.

Se recoge el ligero precipitado formado por centrifugación a 10.000 g: se aislan 5 g de precipitado (fracción C).

25 A la capa que sobrenada se añaden sulfato amó-

nico puro, cristalizado, a razón de 250 g/litro, y se agita durante 30 minutos, seguidamente se lleva el pH del medio a 3 por adición de algunas gotas de ácido sulfúrico 2 N. El precipitado formado se recoge por centrifugación a 10.000 g, y la capa que sobrenada se descarta; se obtienen 25 g de precipitado (fracción D).

5

C) Resultados

Se disuelve el precipitado de la fracción C en 25 ml de agua destilada estéril, apirógena, y se lleva el pH a 7 con sosa 0,1 N. Se filtra de forma estéril la disolución obtenida su valoración en uroquinasa es igual a 10.000 unidades UTA/ml.

10

El precipitado de la fracción D se disuelve en 150 ml de agua destilada estéril, apirógena. El pH se lleva a 7 con sosa 0,1N, y la disolución obtenida se filtra de forma estéril. Su valoración en uroquinasa es igual a 300.000 unidades UTA/ml. Su actividad específica sobre proteína es de 43.000 unidades UTA por mg de proteínas.

15

Ello ha llevado a hacer también aquí las mismas observaciones que en el caso precedente. Se comprueba que la mayor parte de las sustancias pirógenas ha sido retenida en la fracción C, en tanto que la fracción D está exenta de sustancias pirógenas según las normas de la Farmacopea Francesa, como se deduce en la Tabla II siguiente, establecida en condiciones semejantes a las referidas

20

25

en relación con la Tabla I.

5 Ni que decir tiene que en lugar del sulfato amónico puede utilizarse cualquier otra sal conocida por su aptitud para precipitar proteínas, tales como, por ejemplo, el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, etc., quedando convenido que es necesario, en cada caso, determinar ante todo el grado de saturación de la disolución inicial en la sal considerada que conducirá a una precipitación de proteínas en las condiciones indicadas anteriormente.

10

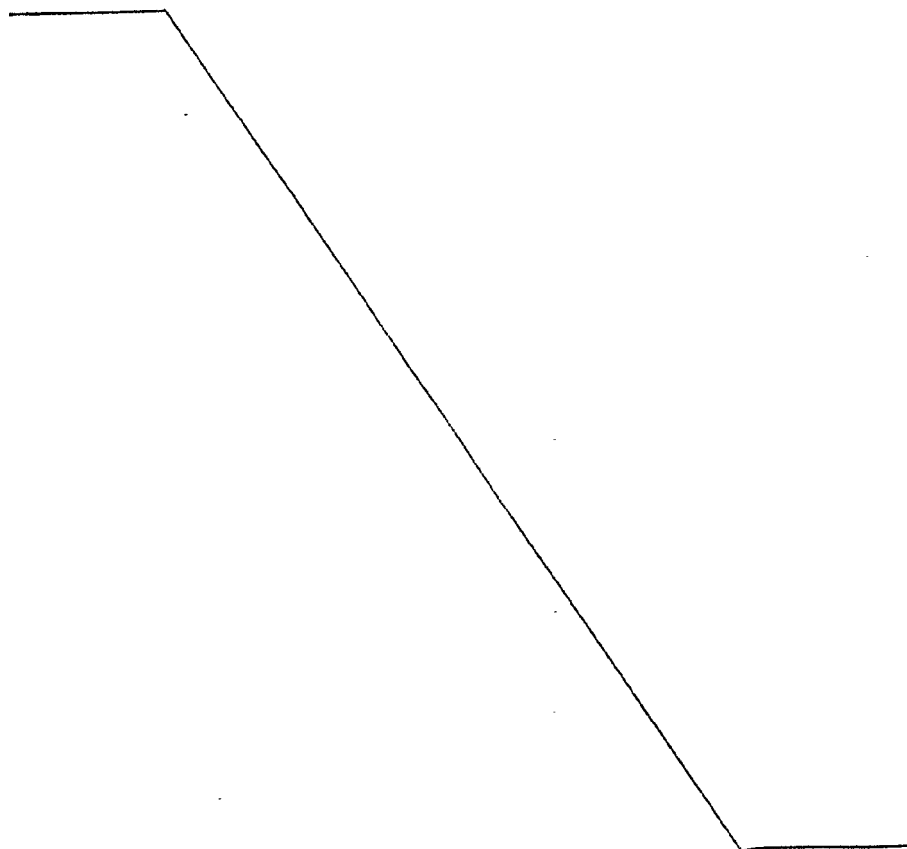


TABLA II

Disolución o fracciones ensayadas	Elevaciones de temperatura en cada uno de los conejos ensayados		
	Serie de 3 conejos	Serie de 8 conejos	Valor medio (8 conejos)
Disolución inicial 3.000 uCTA/kg	101,009,008		009
Fracción C 3.000 uCTA/kg	009,008,008		008
Fracción D 15.000 uCTA/kg	001, 001, 001	00,00,00,003,001,001,003,00	007
Fracción D 20.000 uCTA/kg		00,00,00,00,001,001,003,003	001

Como consecuencia de esto se obtiene un procedimiento de despirogenación, e igualmente de concentración relativa a la uroquinasa frente a su contenido en proteínas, simple y particularmente eficaz, con un rendimiento del 95%, como mínimo, en actividad de uroquinasa, con lo cual la uroquinasa obtenida apirógena a dosis elevadas, puede administrarse entonces a los pacientes sin efecto secundario alguno en dosis de 150.000 UCTA o más, en una sola inyección por vía intravenosa, para el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente, bien tal cual, bien bajo una forma distinta, por ejemplo después de la transformación en heparinato de uroquinasa, por ejemplo en las condiciones descritas a continuación.

Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Francia, el 24 de Septiembre de 1971, con el Nº71 34.435 y el 30 de Junio de 1972, con el Nº 72 23.858 y 72 23.867, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se

presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5. 1ª.- Procedimiento de purificación de una solución de uroquinasa mezclada con proteínas extrañas y sustancias pirógenas, caracterizado porque se produce una saturación parcial de la solución acuosa de uroquinasa con un agente de precipitación de proteínas constituido por sulfato de amonio, hasta un grado, función de la concentración inicial de la solución en proteínas, tal que esta saturación parcial no induce más que la precipitación parcial de una parte de las proteínas contenidas en la solución inicial, siendo esta parte suficientemente reducida para que su contenido en uroquinasa se mantenga en proporciones débiles predeterminadas, si no prácticamente despreciables, y porque se recoge la capa sobrenadante que contiene uroquinasa.

10 20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la saturación de la solución no sobrepasa un valor para el cual el precipitado formado implicaría más del 5% de la actividad total en sustancia proteica de la solución inicial.

25 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en el cual la concentración en proteínas de la solución que contiene la uroquinasa a purificar está comprendida

entre 1,5 y 3 miligramos por mililitro, caracterizado porque se regula el pH de la solución a un valor comprendido entre 3 y 4,5 y la conductividad de esta solución a un valor comprendido entre 15.000 y 25.000 micromhos, porque se determina el valor de la concentración en sulfato de amonio necesaria, teniendo en cuenta la concentración inicial de la solución en proteínas, para la formación en esta solución de un precipitado que contiene 2 a 5% de la actividad de uroquinasa, porque se añade a esta solución la cantidad de sulfato de amonio necesaria para la obtención de la concentración así determinada y porque se recoge la capa sobrenadante.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado porque se ajusta la concentración de la solución en sulfato de amonio al valor correspondiente a un grado de saturación de la solución igual a 0,3.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se ajusta la concentración de la solución en sulfato de amonio al valor correspondiente a un grado de saturación igual a 0,3.

6ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la capa sobrenadante se precipita con un exceso del agente de precipitación y el precipitado se separa por centrifugación.

7ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª,
caracterizado porque el precipitado se recoge a pH 7
en agua destilada estéril y desprovista de pirógenos.

5 8ª.- Procedimiento de purificación de una so-
lución de uroquinasa mezclada con proteínas extrañas y
sustancias pirógenas.

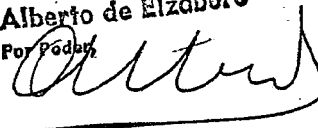
Tal y como se ha descrito en la Memoria que
antecede, representado en los dibujos que se acompañan
y con los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de cuarenta y dos hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 15.FEB.1977

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poderes



100000

