



COMO DIVISIONAL DE LA  
PATENTE DE INVENCION  
Nº 427.232 del 12.6.73

ES 447851 A1  
FECHA DE PRESENTACION  
12.5.76

PATENTE DE INVENCION



50 PRIORIDADES: 51 NUMERO 52 FECHA 53 PAIS	52.309A/73	3.9.73	italiana
---	------------	--------	----------

64 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G; A61M	63 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

60 TITULO DE LA INVENCION:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PREPARADO FARMACOLOGICO QUE TIENE ACCION ANTICOAGULANTE "IN VIVO".

71 SOLICITANTE(S)  
LABORATORI BICCHIMICI FARGAL-PHARMASINT S.p.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
POMEZIA, km. 28, Via Pontina, Italia.

72 INVENTOR(ES)  
Eraldo Antonini, de nacionalidad italiana.

73 TITULAR(ES)  
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

74 REPRESENTANTE



2 MAY 1978

1           Un procedimiento para la extracción y el aislamien  
to del componente enzimático de los venenos de serpiente que  
tiene actividad coagulante "in vitro" y actividad anticoagu-  
lante "in vivo" de los otros componentes que tienen activi-  
5           dad coagulante "in vitro" y de los componentes proteicos,  
en cuyo procedimiento el veneno de serpiente, disuelto en un  
medio adecuado para un tratamiento de separación cromatográ-  
fica se hace pasar por una columna rellena con un soporte  
10           sólido para la absorción selectiva de dicho enzima anticoagu-  
lante "in vivo", no soluble en disolventes acuosos, combina-  
do a un substrato o inhibidor de dicho enzima, se hace pasar  
un primer medio de elución a pH de 6-7 y una molaridad infe-  
rior o igual a 0,05M a través de dicho relleno, en el que ha  
15           sido introducido el veneno, se recoge el eluato en porciones  
sucesivas hasta la elución de más del 95 % de los componentes  
proteicos del veneno y se obtiene una fracción coagulante  
"in vitro", diferente de la presente en el segundo eluato,  
se hace pasar un segundo medio de elución a un pH incluso  
20           mayor de 9 y una molaridad superior o igual a 0,3M, se reco-  
ge el eluato en porciones sucesivas hasta que se obtiene la  
elución del enzima anticoagulante "in vivo" absorbido en la  
columna, junto con menos del 5 % de componentes proteicos;  
la invención también se refiere a un preparado farmacológico  
25           anticoagulante obtenido de acuerdo con el procedimiento  
anterior.

MEMORIA

30           El objeto de esta invención es un procedimiento para  
la extracción de componentes que tienen actividad anticoagu-  
lante "in vivo" de los venenos de serpiente y de productos  
afines. Más especialmente, la invención se refiere a un pro-



MAY 1970

1 cedimiento para obtener, con un alto grado de pureza, los  
componentes anticoagulantes "in vivo" enzimáticos de los ve-  
nenos de serpiente por técnicas de separación cromatográfi-  
ca de los componentes del veneno.

5 Como es sabido, el veneno de varias especies de ser-  
pientes contiene enzimas que poseen la propiedad de catali-  
zar "in vitro" la gelificación del fibrinógeno del plasma  
de los mamíferos y, por lo tanto, de causar la coagulación  
de la sangre, del plasma y de las soluciones de fibrinógeno.  
10 Sin embargo, algunos de estos enzimas, si se utilizan "in  
vivo", tienen la propiedad de inducir una marcada reducción  
del fibrinógeno y de producir una anticoagulación de la san-  
gre. Por ejemplo, es característico el caso del veneno de  
Ancistrodon rhodostoma que tiene propiedades coagulantes  
15 "in vitro" y propiedades anticoagulantes "in vivo". Este he-  
cho encuentra una explicación en la presencia, en el veneno  
de las serpientes, además de otros componentes proteicos,  
de dos tipos de enzimas, ambos dotados de actividad coagu-  
lante "in vitro" pero uno de los cuales, si se inyecta en  
20 la sangre de un animal, presenta una acción totalmente opues-  
ta, produciendo la anticoagulación de la sangre.

Por lo tanto, es evidente la importancia de un proce-  
dimiento que, como el de esta invención, sea capaz de sepa-  
rar los componentes del veneno de las serpientes y aislar,  
25 con un alto grado de pureza, los componentes de acción anti-  
coagulante "in vivo" que pueden ser empleados, con excelen-  
tes resultados, para la producción de preparados de acción  
farmacológica.

30 Hasta ahora la operación de separación de los cons-  
tituyentes enzimáticos del veneno de las serpientes se ha



2 MAY 1976

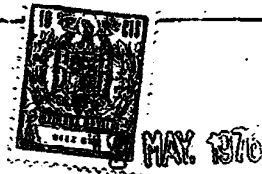
1 realizado por cromatografía sobre resinas cambiadoras de  
ión y/o por técnicas de fraccionamiento por precipitación  
con sales o con disolventes adecuados.

5 Estas técnicas, sin embargo, no garantizan ni un  
grado satisfactorio de pureza ni una cantidad de trabajo ra-  
zonablemente pequeña.

10 Por lo tanto, el principal objeto de esta invención  
es proporcionar un procedimiento de separación de dichos  
enzimas, que garantice tanto la pureza del enzima anticoagu-  
lante "in vivo" como la rapidez de las técnicas de opera-  
ción.

15 El procedimiento, de acuerdo con esta invención, con-  
sidera el uso de una columna cromatográfica rellena con un  
material de soporte no soluble en los disolventes acuosos,  
destinado a la absorción selectiva del enzima anticoagulan-  
te "in vivo", al que está firmemente combinado un substrato  
o inhibidor de dicho enzima. Cuando el veneno de la serpien-  
te, previamente preparado para el tratamiento cromatográfi-  
co, se hace pasar a través de la columna, bajo condiciones  
20 adecuadas de pH y de fuerza iónica, solamente se efectúa la  
absorción del enzima anticoagulante "in vivo" mientras que  
los otros componentes del veneno no son absorbidos. Poste-  
riormente, por elución del sistema soporte-enzima con solu-  
ciones a un pH diferente del inicial o con soluciones que  
25 contienen un substrato o inhibidor del enzima libre, se se-  
para el enzima deseado de la columna con un alto grado de  
pureza.

30 Por lo tanto, un objeto específico de esta inven-  
ción es un procedimiento para la extracción y aislamiento  
de los venenos de las serpientes del componente enzimático



1 anticoagulante "in vivo" de los otros componentes que po-  
seen acción coagulante "in vitro" y de los componentes pro-  
teicos, caracterizado porque el veneno de la serpiente, di-  
suelto en un medio adecuado para el tratamiento cromatográ-  
5 fico, se hace pasar a través de una columna rellena con un  
soporte sólido para la absorción selectiva de dicho enzima  
anticoagulante "in vivo", no siendo dicho soporte soluble  
en los disolventes acuosos, combinado a un substrato o inhi-  
bidor de dicho enzima, después pasar a través de dicho re-  
10 lleno un primer medio de elución a pH 6-7 y con una molaridad  
inferior o igual a 0,05M, recoger el eluato en porciones  
sucesivas hasta que se consigue la elución de más del 95 %  
de los componentes proteicos del veneno y de una fracción  
de la actividad coagulante "in vitro", hacer pasar un se-  
15 gundo medio de elución a un pH incluso superior a 9 y con  
una molaridad superior o igual a 0,3M y recoger el eluato  
en porciones sucesivas hasta que se obtiene prácticamente  
la cantidad total del enzima coagulante "in vivo" adsorbido  
por la columna, junto con menos del 5 % de los componentes  
20 proteicos.

Para la preparación de un producto adecuado para  
uso farmacológico, este segundo eluato se diluye después  
con agua hasta un contenido de unidades trombónicas (NIH)  
igual a 25 unidades por mililitro, se esteriliza por filtra-  
25 ción a través de filtros porosos, añadiendo un soporte de  
liofilización al filtrado y el material así obtenido se sub-  
divide en dosis de 1 o 2 ml (25-50 unidades NIH) distribuí-  
das en ampollas y se liofiliza.

De acuerdo con la invención, en el caso del veneno  
30 Ancistrodon rhodostoma, el aminoácido arginina es combinado



1 mediante un enlace covalente al relleno de soporte sólido de  
 la columna, como inhibidor del enzima anticoagulante "in  
 vivo". En lo que se refiere al material de soporte, se pre-  
 para de acuerdo con uno de los métodos generales ya conoci-  
 5 dos para combinar sustancias que contienen grupos amino con  
 matrices insolubles de diferentes tipos. Han resultado espe-  
 cialmente adecuadas las sustancias poliméricas característi-  
 camente insolubles en los disolventes acuosos, que contienen  
 grupos hidroxilo, como el gel de dextrano o la celulosa que  
 10 han sido tratados con bromuro de cianógeno.

Como se ha dicho anteriormente, después se añade una  
 solución de arginina a estas sustancias activadas con bromu-  
 ro de cianógeno, con formación de un compuesto entre la ma-  
 triz sólida (resina) y el resto de arginina.

15 Especialmente adecuado como soporte ha resultado ser  
 el gel de dextrano preparado por la firma Pharmacia bajo  
 el nombre comercial de "Sephacose".

A continuación se dan algunos ejemplos ilustrativos  
 pero no limitativos del procedimiento de acuerdo con esta  
 20 invención, relativos al veneno de Ancistrodon rhodostoma  
 (Ejemplo 1) y al aislamiento de este enzima anticoagulante  
 "in vivo" y también a la preparación de un producto farma-  
 cológico con acción anticoagulante (Ejemplo 2).

EJEMPLO 1

25 Purificación de la actividad coagulante del veneno del Ancis-  
trodon rhodostoma

Se prepara una columna cromatográfica con un diáme-  
 tro de 0,7 cm, conteniendo 10 ml de gel compactado consti-  
 tuido por "Sephacose" combinado con arginina. La columna se  
 30 equilibra con un regulador de fosfato de tri(hidroximetil-



2 MAY 1976

1 aminometano) 0,05M a pH 7, denominado aquí tri-fosfato por razones de brevedad.

5 Se disuelven 50 mg del veneno liofilizado de Ancistrodon rhodostoma en 1 ml del mismo regulador empleado para equilibrar la columna. La solución de veneno se introduce en la columna que posteriormente se eluye con el regulador de tri-fosfato 0,05M a pH 7. El eluato se recoge en fracciones de unos 2 ml. Los primeros 30 ml de eluato contienen más del 90 % de las proteínas totales presentes en el veneno in-  
10 troducido en la columna y alrededor de 180 unidades de actividad coagulante "in vitro". (Una unidad arbitraria de actividad coagulante se define, para los fines de los siguientes experimentos, como la cantidad de enzima que produce la formación inicial visible de fibras de fibrina, con agitación, en 15 segundos a la temperatura ambiente en una solución al  
15 0,5 % de fibrinógeno humano; esta unidad es diferente de la unidad NIH ya mencionada anteriormente y definida como unidad trombínica de acuerdo con la norma NIH). Después de haber pasado los primeros 30 ml del eluato, la solución eluyente se cambia a regulador tri-HCl 0,2M a pH 9,3. Después se recoge el eluato del nuevo regulador siempre en porciones de 2 ml. Los primeros 20 ml de este nuevo eluato contienen  
20 menos del 10 % de las proteínas presentes en los 50 mg de veneno introducidos en la columna y alrededor de 420 unidades coagulantes.  
25

Debe observarse que:

- 30 a) el segundo eluato contiene, por lo tanto, la mayor parte de la actividad coagulante y solo una pequeña fracción de las proteínas del veneno de Ancistrodon rhodostoma.
- b) La actividad coagulante presente en el primer

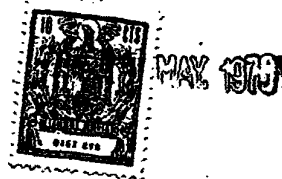


2 MAY 1978

1 eluato es diferente de la presente en el segundo eluato y  
no convertible en esta última, como resulta evidente me-  
diante el siguiente ensayo.

5 Las fracciones más activas con respecto a la actividad  
coagulante del primer eluato en regulador de tri-fosfato  
0,05M a pH 7 se introducen de nuevo en la columna ya des-  
crita en este ejemplo, equilibrada de nuevo con solución  
reguladora 0,05M a pH 7,0. Se realiza la elución con la mis-  
ma solución reguladora; la actividad coagulante total intro-  
10 ducida en la columna es ahora eluída en los primeros 20 ml;  
el eluato subsiguiente con regulador tri-HCl 0,2M a pH 9,3  
esta vez no presenta ninguna actividad coagulante signifi-  
cativa.

15 Se han obtenido resultados similares a los mencio-  
nados en un número muy grande de ensayos realizados con los  
mismos métodos utilizados para el ensayo anteriormente des-  
crito en los que, sin embargo, se ha modificado la composi-  
ción de las soluciones reguladoras utilizadas para la prime-  
ra y la segunda elución. Para la primera elución, donde la  
20 mayor parte de la actividad coagulante "in vitro" es reteni-  
da en la columna, se han utilizado reguladores de tri-fosfa-  
to con molaridades inferiores o iguales a 0,05M y unos valo-  
res del pH comprendidos entre 6 y 7. Para la segunda elución,  
que retira de la columna la mayor parte de la actividad cca-  
25 gulante "in vitro", se han utilizado reguladores con molari-  
dades superiores o iguales a 0,3M y valores del pH compren-  
didos entre 6 y 7 o superiores a 9. A continuación damos un  
ejemplo específico de los diferentes métodos de absorción y  
30 elución con respecto al ensayo anteriormente descrito.



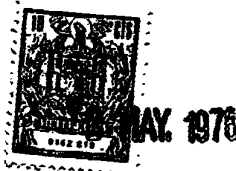
EJEMPLO 2

Purificación de una actividad coagulante "in vitro" del veneno de Ancistrodon rhodostoma y formación de un preparado con propiedades anticoagulantes "in vivo" y adecuado para uso terapéutico

Se prepara como en el ejemplo anterior una columna cromatográfica con un diámetro de 0,7 cm, conteniendo 10 ml de gel compactado constituido por "Sepharose" que ha reaccionado con arginina. La columna se equilibra con un regulador de tri-fosfato 0,01M a pH 6,0. Se disuelven 500 mg de veneno liofilizado de Ancistrodon rhodostoma en 5 ml del mismo regulador (tri-fosfato 0,01M a pH 6) y la solución se hace pasar a través de la columna.

Después la columna se lava haciendo pasar a su través 30 ml de regulador de tri-fosfato 0,01M a pH 6,0. El eluato se recoge en fracciones de 2 ml. Después la solución eluyente se cambia por otra constituida por solución de tri-fosfato 0,3M a pH 6,0. Se pasan por la columna 75 ml de esta última solución y el eluato se recoge en fracciones de 2 ml.

El primer eluato (tri-fosfato 0,01M a pH 6) contiene más del 95 % de las proteínas inicialmente presentes en 500 mg de veneno y alrededor de 2200 unidades de actividad coagulante. El segundo eluato (tri-fosfato 0,3M a pH 6,0) contiene menos de 5 % de las proteínas inicialmente presentes en el veneno y 6000 unidades (unidades arbitrarias) de actividad coagulante "in vitro". El material proteico allí presente, concentrado por ultrafiltración, resulta ser esencialmente homogéneo cuando se analiza con la ultracentrífuga o por electroforesis sobre gel.



1           Este segundo eluato se diluye con agua hasta que  
contiene 25 unidades NIH (unidades trombónicas NIH) por  
mililitro. Después se esteriliza por filtración a través de  
5           filtros de porosidad apropiada, se añade un material adecua  
do que actúa como soporte de la liofilización y se liofili-  
za. Es conveniente liofilizar el material después de distri-  
buirlo en ampollas en cantidades de 1 o 2 ml correspondien  
tes a 25 o 50 unidades NIH.

10           El material así liofilizado, una vez redissuelto  
por adición de agua, resulta presentar una actividad coagu-  
lante "in vitro" no modificada incluso después de varios me-  
ses de preservación a la temperatura ambiente. Inyectado  
intravenosamente a un conejo en dosis de 1 unidad NIH por  
15           kg de peso corporal, induce una disminución intensa o la  
desaparición del fibrinógeno de la sangre en algunas horas,  
en ausencia de fenómenos colaterales y fenómenos secunda-  
rios significativos.

            Esto se pone en evidencia mediante los siguientes  
ensayos:

20           Se estabulan 8 conejos, se pesan y se dividen en  
cuatro grupos de dos animales cada uno. A cada animal se  
inyectan intravenosamente unas dosis de material purificado  
iguales a 1 unidad NIH por kg de peso corporal, de acuerdo  
25           con la actividad previamente determinada "in vitro". La san-  
gre sacada al cabo de 2 horas después de la inyección resul-  
ta no ser coagulable. Se realizaron otras tomas de sangre  
al cabo de 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas, de  
acuerdo con el siguiente programa:



MAY 1970

	<u>Conejo nº</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Conejo nº</u>	<u>Tiempos</u>
1	1	24 h 72 h	5	24 h 72 h
	2	48 h 96 h	6	48 h 96 h
	3	24 h 72 h	7	24 h 72 h
5	4	48 h 96 h	8	48 h 96 h

En las muestras de sangre sacada se determina la fibrinogenemia por un método gravimétrico. Los datos obtenidos se dan a continuación, expresados como mg de fibrinógeno por ml de plasma.

	<u>Conejo nº</u>	<u>Tiempo</u>	<u>mg fibrinógeno/ml plasma</u>
10	1	24 h	ausente
	3	24 h	ausente
	5	24 h	principio de formación de fibrinógeno: no mensurable
	7	24 h	principio de formación de fibrinógeno: no mensurable

15	2	48 h	6,2
	4	48 h	-
	6	48 h	4,1
	8	48 h	4,3

	<u>Conejo nº</u>	<u>Tiempo</u>	<u>mg/fibrinógeno/ml plasma</u>
20	1	72 h	8,1
	3	72 h	-
	5	72 h	7,7
	7	72 h	-

25	2	96 h	10,5
	4	96 h	15,6
	6	96 h	8,8
	8	96 h	-

En otros conejos no tratados se tomaron muestras de sangre en las que se determinó la fibrinogenemia con los

30



1 siguientes resultados.

<u>Conejo nº</u>	<u>mg/fibrinógeno/ml plasma</u>
1	10
2	16
5 3	8,4

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento para la producción de un preparado farmacológico que tiene acción anticagulante "in vivo", partiendo de un enzima extraido del veneno de Ancistrodon rhodostoma, caracterizado por el hecho de diluir dicho enzima con agua hasta un contenido de 25 unidades NIH por mililitro, esterilizar dicho líquido por filtración a través de filtros porosos, agregar un soporte de liofilización y liofilizar dicho material despues de distribuirlo en ampollas en cantidades de 1 o 2 ml. por ampolla (25 o 50 unidades NIH).

20 2. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PREPARADO FARMACOLOGICO QUE TIENE ACCION ANTICOAGULANTE "IN VIVO".

25 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de doce páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 12 mayo 1.976

BERNARDO JUNGLEA

D.P.