



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A3
		21	407810		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			14-4-77		

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL
			C12K

54	TITULO DE LA INVENCIÓN
	UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UROKINASA.
56	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION
	Patente Estadounidense nº 3,930,944 publicada el 6-1-76

71	SOLICITANTE (SI)
	ABBOTT LABORATORIES
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	North Chicago, Illinois 60064, Estados Unidos
72	INVENTOR (ES)
73	TITULAR (ES)
74	REPRESENTANTE
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 La urokinasa es conocida desde 1951 aproximadamente
como sustancia capaz de efectuar la transformación del plas-
minógeno en plasmina. Como tal, ha encontrado aplicación co-
mo activador para provocar la lisis de los coágulos sanguí-
5 neos. Desgraciadamente, una sola dosis capaz de disolver un
coágulo sanguíneo requiere una cantidad bastante grande de
urokinasa que, hasta 1962, era extraída fundamentalmente de
la orina. Desde entonces, se han utilizado cultivos de célu-
las de riñón de diversos animales para producir urokinasa,
10 cultivándolos en un medio adecuado. La urokinasa obtenida
de esta manera es inmunológicamente indistinguible de la
urokinasa urinaria utilizada anteriormente. Las células de
riñón pueden ser propagadas en gran escala antes de ser uti-
lizadas para la producción de urokinasa pero incluso enton-
15 ces, la producción de urokinasa es costosa y limitada por el
espacio requerido para esta operación.

 Para suministrar cantidades suficientes de la droga
para uso en el campo de la terapia de los coágulos sanguíneos
en el hombre, el cultivo celular, los medios utilizados para
20 desarrollar el cultivo celular y el método de propagación
de estas células han sido sometidos a diversas experimen-
taciones para optimizar la producción de urokinasa. Desgraciada-
mente, el éxito ha sido hasta ahora bastante limitado y la
cantidad de urokinasa producida ha sido solamente suficiente
25 para realizar estudios experimentales. Más especialmente,
la producción de urokinasa por unidad de superficie de culti-
vo y de tiempo debe ser aumentada para que esta enzima fibri-
nolítica constituya una herramienta asequible para el trata-
miento de los coágulos en el hombre.

30 Por lo tanto, un objeto de esta invención es aumentar

1 la producción de urokinasa en los cultivos celulares propaga-
dos. Un objeto especial de esta invención es aumentar el ren-
dimiento de urokinasa a partir de un cultivo celular con ob-
jeto de obtener un rendimiento mucho mayor en cantidad pero
5 sin afectar adversamente a la calidad del material.

Estos y otros objetos se han cumplido mediante el pro-
cedimiento de producción de urokinasa a partir de un cultivo
celular de riñón contiguo en un medio nutritivo orgánico que
contiene entre 0,06 y 0,5 microgramos de pronasa por milili-
10 tro de dicho medio.

Los medios nutritivos son conocidos y han sido descri-
tos desde hace mucho tiempo. Se han utilizado en frascos in-
dividuales, así como en placas Petri, cámaras rosas o en el
equipo de cultivo conocido como propagador de cultivo tisu-
15 lar en masa (PCTM) que permite la producción a gran escala
de urokinasa a partir de células de riñón. El uso del PCTM
elimina algunos de los inconvenientes del cultivo de células
de mamíferos en frascos, fundamentalmente la necesidad de un
número extraordinariamente grande de frascos para la producción
20 en gran volumen, y los problemas logísticos asociados con el
uso de este gran número de frascos. El PCTM también proporció-
na un medio de mantener las mismas condiciones para todas las
células de las diversas capas individuales y permite mantener
la uniformidad del pH, del oxígeno disuelto y del dióxido de
25 carbono disuelto en todo el medio. El PCTM está constituido
esencialmente por una vasija de vidrio que contiene un cierto
número de placas o platos de vidrio de poco fondo, apilados
una sobre otra. Este propagador se llena después hasta cubrir
exactamente las placas con un medio que contiene el número
30 deseado de células. Las células se adhieren a las placas y

1 crecen sobre ellas. Se introduce una mezcla de dióxido de
carbono y aire y se suministra continuamente para proporci-
onar oxígeno y controlar el pH del medio conocido, habitual-
mente tamponado con bicarbonato. Si se desea, pueden utili-
5 zarse medios mecánicos para hacer circular el medio sobre
el cultivo celular.

En las operaciones de producción, las células se hacen
crecer primero hasta la confluencia en el medio de cultivo
celular; después el medio de cultivo se sustituye completa-
mente por un segundo medio adecuado para la producción de
10 urokinasa por las células así cultivadas. Es a este último
medio al que se refiere la presente invención.

En una realización general de esta invención, se cul-
tivan en matraces de plástico o de vidrio células que se sa-
15 be que producen urokinasa; después se plantan en un medio
de cultivo apropiado y se incuban a 37°C en un sistema ce-
rrado después de haber gasificado este último con dióxido
de carbono hasta un pH de 7,2. Al llegar a la confluencia,
las células se lavan con solución salina tamponada y el lí-
20 quido obtenido se sustituye por un medio de mantenimiento
adecuado, que contiene diversos aditivos necesarios para man-
tener estas células y su producción de urokinasa.

Aunque el crecimiento de las células hasta la confluencia y el mantenimiento de su producción han sido descritos
25 en la bibliografía, ahora se ha encontrado que esta produc-
ción de urokinasa puede ser aumentada significativamente
añadiendo al medio entre 6 y 50 microgramos de pronasa por
cada 100 partes en volumen de medio. Normalmente, al cabo
de unas 4 o 5 semanas, el cultivo ha producido un óptimo co-
30 mercial de urokinasa. Por óptimo comercial se entiende que

1 la cantidad de urokinasa obtenida no es necesariamente la
máxima obtenible sino una cantidad que reduce la eficiencia
de producción de nueva urokinasa hasta el punto en que resul-
ta más interesante comenzar con un lote nuevo de cultivo mo-
5 nocapa (contiguo).

Para ilustrar la ventaja obtenida mediante esta inven-
ción, remitimos a los siguientes ejemplos específicos, sin
embargo, no se pretende que limiten la invención en modo
alguno.

10 EJEMPLO 1

Unas células de riñón embrionario humano cultivadas
en matraces Falcon de 75 mm se plantan a razón de 5×10^5
células en 40 ml del medio nutritivo constituido por medio
Parker, descrito en el catálogo biológico Grand Island
15 (GIBCO) y conteniendo 1 x BME (vitaminas y aminoácidos basa-
les mínimos esenciales, descritos en la misma referencia)
así como un 10 % en volumen de suero de ternera fetal. Los
matraces se incuban a 37°C en un sistema cerrado después de
gasificarlos con dióxido de carbono hasta un pH de 7,2. Cuan-
do se obtiene la confluencia o una monocapa contigua de célu-
20 las, se lavan las células con una solución acuosa de cloruro
sódico al 0,8 %, tamponada con fosfato a un pH de 7,4.

Las aguas de lavado se sustituyen ahora por el medio
de mantenimiento constituido por 0,5 % en peso de hidrolizado
de lactalbúmina, 0,1 % en peso de seroalbúmina humana, 0,6 %
25 en peso de glicina y 0,18 % en peso de glucosa en 0,8 % de
solución salina equilibrada de Earle conteniendo 0,8 g/l de
bicarbonato sódico. En las muestras de ensayo, se agrega
pronasa a este medio al iniciarse el ciclo de producción de
30 urokinasa y se toman muestras a diversos intervalos. Los re-

1 sultados obtenidos están indicados como títulos de urokinasa por mililitro, al cabo de los días indicados en la Tabla I.

TABLA I

<u>Aditivo</u>	<u>Día 8</u>	<u>Día 15</u>	<u>Día 22</u>	<u>Día 29</u>	<u>Día 36</u>
5 Control	118	222	378	541	632
0,06 µg/ml	226	533	606	950	965
0,13 µg/ml	261	400	574	973	927

10 Como puede verse en la tabla anterior, la producción de urokinasa aumenta entre 50 y 100 % con cualquiera de las proporciones de pronasa agregada al medio nutritivo, obteniéndose los máximos aumentos posibles en los primeros días de la producción de urokinasa.

EJEMPLO 2

15 Se utiliza el mismo medio nutritivo que en el Ejemplo 1 para células de riñón preparadas y cultivadas en una estructura totalmente contigua en los matraces anteriormente descritos. Sin embargo, en este experimento, se agregan 0,5 µg/ml de pronasa solamente al noveno día del ciclo de producción. Los resultados están expresados de la misma forma que antes, a los diversos días del ciclo de producción y se encuentran en la Tabla II.

TABLA II

<u>Aditivo</u>	<u>Día 10</u>	<u>Día 17</u>	<u>Día 24</u>
25 Control	298	490	926
0,5 µg/ml	508	792	1043

30 Se observará en el ejemplo anterior que la adición de pronasa ejerce un efecto muy pronunciado sobre la producción de urokinasa y, como resultado de ello, permite utilizar cultivos celulares de valor solamente marginal para la propagación de la urokinasa. Con el cultivo celular óptimo, siem-

1 pre se observan grandes aumentos. Estos aumentos oscilan entre el 50 y 100 % de lo normal esperado del mismo medio nutritivo o de mantenimiento que no disfruta del beneficio de la pronasa agregada.

5 Es interesante observar y sorprendente descubrir que una enzima particular dentro de unos límites particulares produce los notables e inesperados resultados antes descritos. Es especialmente sorprendente hallar que no son útiles cantidades ilimitadas de pronasa y que la cantidad óptima del suplemento está comprendida entre 0,06 y 0,5 microgramos por mililitro del medio de producción nutritivo. Las cantidades inferiores a 0,06 $\mu\text{g/ml}$ producen aumentos muy pequeños pero todavía comercialmente útiles en la producción de urokinasa mientras que las cantidades superiores a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ suelen ser perjudiciales para este fin. Un intervalo preferido de acción de la pronasa es el comprendido entre 0,06 y 0,2 $\mu\text{g/ml}$, ya que las proporciones superiores a estos límites contribuyen poco a la producción, a excepción del evidente aumento del coste.

15 Como se ha señalado anteriormente, los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza para la producción de urokinasa una estructura monocapa contigua de células, adherida a una superficie sólida. Estas estructuras monocapa han sido utilizadas por investigadores anteriores y han sido descritas en la bibliografía. La temperatura óptima para el procedimiento anterior de producción de urokinasa es de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$; a temperaturas inferiores a este nivel, la producción de urokinasa es más lenta de lo que puede conseguirse y a temperaturas superiores, aumenta el peligro de dañar a las células que producen la urokinasa, hasta el punto de que la producción

1

queda comprometida.

5

Como observarán los expertos en el campo del mantenimiento de células vivas en un medio nutritivo, el efecto beneficioso anteriormente demostrado puede conseguirse con cualquier tipo de medio nutritivo utilizado para las células de riñón. Estos medios pueden contener diversas proporciones de minerales y/o vitaminas, tampones, etc y diversas concentraciones de ingredientes como la solución salina equilibrada de Earle comúnmente utilizada, bicarbonato sódico y otros aditivos normalmente empleados como nutrientes para los fines citados.

10

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

15

REIVINDICACIONES

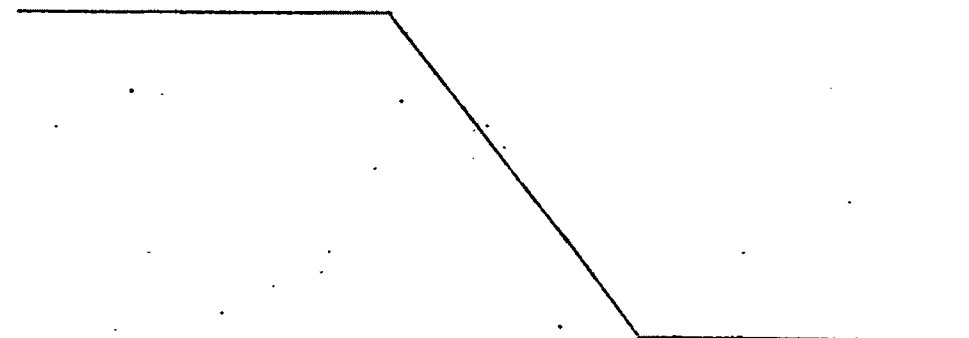
20

1. Un procedimiento de producción de urokinasa a partir de un cultivo contiguo de células de riñón vivas, en un medio nutritivo acuoso que contiene, además de los aditivos habituales para el mantenimiento del cultivo celular, entre 6 y 50 μg de pronasa por 100 mililitros de dicho medio nutritivo.

25

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicha pronasa se utiliza en una proporción comprendida entre 6 y 20 μg .

30

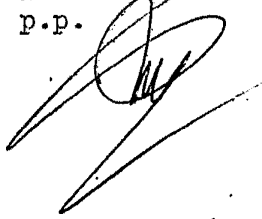


do

1. 3. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Introducción que se solici-
ta: UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UROKINASA.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva que consta de nueve páginas
mecanografiadas.

Madrid, 14 de Abril de 1977
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

20

25

30



x