

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

20 NOV. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

19 ES	11	NUMERO	10 A1
	21	468.720	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		12-4-1978	

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
77/11004	12-4-1977	Francia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	B01D; C07G//A61K	

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO DE SEPARACION DE DOS TIPOS DE UROQUINASA"

71 SOLICITANTE (S)	
CHOAY S.A.	(PL-0236 78 B)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
48, Avenue Théophile-Gautiers, 75782 Paris Cedex 16, Francia	
72 INVENTOR (ES)	
Jean-Claude LORMEAU, Jean CHOAY y Jean GOULAY	
73 TITULAR (ES)	
74 REPRESENTANTE	
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ	
	(P.-68.741)

jga

1 La invención se refiere a nuevas composiciones far-
macéuticas a base de uroquinasa, susceptibles de ser utili-
zadas en condiciones que pueden ser más favorables que las
5 que se recomiendan corrientemente, habida cuenta de la na-
turalidad de la uroquinasa contenida en estas nuevas compo-
siciones, y a un procedimiento de obtención de una tal uro-
quinasa.

 Es ya sabido que las uroquinasas que se encuentran
en el comercio están constituidas a menudo por mezclas, par-
10 ticularmente de dos tipos de uroquinasa, las cuales se dis-
tinguen esencialmente por sus pesos moleculares, del orden
de 33.000 para uno de entre ellos, y del orden de 54.000 pa-
ra el otro. Estos dos tipos, que se designarán en lo que si-
gue por las designaciones "uroquinasa I" y "uroquinasa II",
15 respectivamente, no han sido, sin embargo, apenas objeto,
hasta este día, de estudios que hayan desembocado en la com-
probación de que los mismos podrían presentar propiedades
diferentes. Igualmente, faltaba hasta hoy un procedimiento
que permitiera efectuar su separación en gran escala y, al
20 mismo tiempo, con una sencillez y una selectividad suficien-
tes. En efecto, un procedimiento basado en la única dife-
rencia de sus pesos moleculares, diferencia que es demasia-
do pequeña, no podía responder a tales exigencias.

 La invención es consecuencia del descubrimiento
25 de que esta separación podía hacerse de hecho en condicio-
nes satisfactorias y con buenos rendimientos, por una téc-
nica que utiliza un gel que tiene propiedades que permiten
el intercambio de iones.

 La invención deriva del descubrimiento de que la
30 actividad enzimática de la uroquinasa II con respecto al

1 plasminógeno nativo, tal como existe en la sangre humana,
es netamente más importante que la de la uroquinasa I; que
ocurre también lo mismo con la cinética de la acción de la
uroquinasa II, más importante que la de la uroquinasa I, en
5 lo que concierne a la lisis de los coágulos formados sobre
diferentes substratos de sangre humana (sangre total, plas-
ma rico en plaquetas y plasma desprovisto de plaquetas).

La uroquinasa II, sensiblemente exenta de uroqui-
nasa I, puede por tanto encontrarse en la base de la elabo-
10 ración de esquemas terapéuticos nuevos que ponen en juego
dosis de uroquinasa más reducidas que los esquemas terapéu-
ticos clásicos. Estos esquemas nuevos, tan eficaces como
los esquemas clásicos, pueden conducir además a una mejor
tolerancia de los pacientes con respecto a una terapéutica
15 que ha realizado ciertamente sus pruebas, pero cuya aplica-
ción al nivel clínico sigue siendo aún muy delicada en to-
dos los casos.

En particular, la invención permite por una parte
la elevación del margen de seguridad disponible entre las
20 dosis de uroquinasa para las cuales ésta llega a ser ple-
namente eficaz y aquéllas más allá de las cuales los ries-
gos hemorrágicos resultantes de su acción tienden a ser im-
portantes. De ello se deduce también la disminución de los
riesgos de intervención de la uroquinasa sobre otros facto-
res de coagulación.
25

La presente invención concierne por tanto a compo-
siciones utilizables en terapéutica y administrables parti-
cularmente por inyección, perfusión o medios análogos, a
base de uroquinasa II, que contiene menos de 1% en peso, y
30 por tanto está sensiblemente exenta de otro tipo de uroqui-

1 nasa.

La invención concierne igualmente a un procedimiento de separación de estas dos uroquinasas que se caracteriza por el hecho de que el mismo comprende las etapas que consisten en poner en contacto con un gel que tiene, desde el punto de vista iónico, los caracteres de una resina cambiadora de iones, sobre la cual las uroquinasas son susceptibles de fijarse, la mezcla de uroquinasas a separar en el seno de una solución tamponada a base de una sal mineral del tipo de las que, a una concentración dada, permiten la retención o la fijación de los dos tipos de uroquinasa sobre el gel, cuando éste está en equilibrio con una tal solución tamponada, lavar a continuación dicho gel, particularmente con la misma solución tampón hasta que el efluente ya no contenga nada de proteínas, hacer pasar sobre el gel, en el que están fijadas las uroquinasas, una solución tampón semejante excepto que se hace variar progresivamente su concentración en sal mineral a partir del valor inicial tal como se define arriba hasta el valor para el que ya no puede quedar retenido sobre el gel ningún tipo de uroquinasas, en condiciones de revelado adecuadas para permitir las eluciones sucesivas, pero separadas de los dos tipos de uroquinasa.

Ventajosamente, el gel utilizado es a base de una agarosa cuyas cadenas están reticuladas entre sí, con preferencia un gel de este tipo que contiene grupos carboximetilo. Se obtienen resultados particularmente ventajosos cuando se recurre al gel constituido por la carboximetil-agarosa reticulada en perlas, comercializada bajo la designación "carboximetil-SEPHAROSE^R". Todas las operaciones se

1 realizan con preferencia a baja temperatura, ventajosamente a 4°C aproximadamente.

5 En un modo de utilización preferido del procedimiento de acuerdo con la invención, la solución tamponada se mantiene a un pH comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7, con preferencia del orden de 6, y la sal mineral de la que se hace variar la concentración está constituida por el sulfato de amonio. La concentración inicial de sulfato de amonio de la solución tamponada está comprendida ventajosamente entre 0,01 M y 0,06 M, siendo particularmente del orden de 0,04 M. La disolución de una mezcla de uroquinasas de los tipos I y II en una tal solución tamponada y su puesta en contacto con un gel cambiador de iones, particularmente del tipo "carboximetil-SEPHAROSE", previamente equilibrado con una solución tamponada semejante, permite la fijación de la totalidad de la uroquinasa inicialmente contenida en la mezcla, cuando la cantidad de gel utilizada es suficiente. Ventajosamente, la operación de fijación se realiza por medio de una técnica cromatográfica, estando contenido entonces el gel en el interior de una columna. Los dos tipos de uroquinasa de la mezcla inicial pueden separarse entonces uno del otro por revelado, particularmente según un gradiente lineal, por paso a través de la columna de una solución tamponada de pH semejante cuya concentración en sulfato de amonio se hace crecer progresivamente hasta un valor que puede estar comprendido particularmente entre 0,1 y 0,5 M, siendo con preferencia del orden de 0,25 M. Los productos de elución obtenidos pueden fraccionarse de manera clásica per se, y someterse a análisis en lo que respecta especialmente a sus contenidos respectivos en pro-

1 teínas y sus actividades en uroquinasa, antes de ser reco-
gidos según la naturaleza de su contenido. En particular, se
recogerán los grupos de fracciones que corresponden a cada
uno de los dos picos netos de actividad de uroquinasa que
5 pueden ser puestos así en evidencia, cuando se regulan en
condiciones clásicas per se los diferentes parámetros de elu-
ción.

El procedimiento se aplica de manera ventajosa a
toda uroquinasa que tenga una actividad específica de al
10 menos 5000 uCTA/mg de proteínas, con preferencia igual o
superior a 8000 uCTA/mg de proteínas.

Se indicarán a continuación, a título ilustrativo,
bien entendido no limitante, las condiciones particularmen-
te apropiadas para la separación de las dos fracciones ne-
tas arriba citadas, las cuales corresponden respectivamente
15 a los dos tipos de uroquinasa buscados.

Se prepara una columna de carboximetil-SEPHAROSE^R
de tal manera que tenga 1 ml de gel para 0,1 a 1 millón de
uCTA de uroquinasa, con preferencia 1 ml para 0,4 millones
20 de uCTA.

Esta columna está equilibrada por tampón de sulfa-
to de amonio 0,01 M a 0,06 M, con preferencia 0,04 M, de pH
comprendido entre 4,0 y 7,0, con preferencia 6,0.

La mezcla de uroquinasa a separar se disuelve en
25 este tampón, a razón de 200.000 uCTA/ml y se dializa duran-
te 8 horas, contra 100 a 200 volúmenes de este mismo tampón.
La solución obtenida, después de una eventual centrifuga-
ción para eliminar las materias insolubles que hayan podido
aparecer en el curso de la diálisis, se carga en la columna
30 a un caudal de 0,1 a 1 volumen de columna por hora, con pre-

1 ferencia 0,5 volúmenes/hora. La columna se enjuaga luego por
el tampón de equilibramiento, hasta ausencia de proteínas
en el efluente de la columna.

5 Se revela luego la columna por un gradiente lineal,
obtenido por ejemplo de manera clásica por dos depósitos que
contienen un volumen idéntico de los tampones siguientes:

- depósito 1: 10 a 30 volúmenes de columna, con
preferencia 20 volúmenes, de tampón de equilibra-
miento;
- 10 - depósito 2: el mismo volumen de tampón de sulfato
de amonio, 0,1 a 0,5 M, con preferencia 0,25
M, de pH 4,0 a 7,0, con preferencia 6,0.

Esta operación se efectúa con preferencia a un cau-
dal idéntico al caudal de carga y de lavado de la columna.

15 El efluente de la columna se recoge en un colector
de fracciones, y el contenido en proteínas de este efluente
se analiza de modo continuo por medio de un espectrofotóme-
tro registrador.

20 El diagrama obtenido cuando se representa el conte-
nido en proteínas y en actividad de uroquinasa del efluente,
en función del volumen de elución, es del tipo representado
en la fig. 1.

25 Las proteínas y la actividad de uroquinasa se sepa-
ran en dos picos netos. Las medidas de pesos moleculares
efectuadas sobre la uroquinasa contenida en el primer pico
hacen ver que ésta comprende como constituyente principal
la uroquinasa I que tiene un peso molecular del orden de
33.000 \pm 3.300. El de la uroquinasa recogida en el segundo
pico es del orden de 54.000 \pm 5.400. Así, es posible separar
30 completamente los dos tipos de uroquinasa, hasta tal punto

1 de que se pueden obtener así composiciones que contienen
más particularmente la uroquinasa II, con un grado de pureza
que puede expresarse por el hecho de que la aplicación a
esta composición a base de uroquinasa de un procedimiento
5 que comprende su disolución en una solución de sulfato de
amonio 0,04 M, de pH 6, la puesta en contacto de esta solución
en una columna de cromatografía con un gel del tipo
carboximetil-SEPAHROSE puesto en cantidad suficiente y el
revelado de la columna según un gradiente lineal hasta la
10 obtención de un producto de elución de pH 6 que tiene un con-
tenido en sulfato de amonio de 0,25 M, permite sólo sensiblemente
el aislamiento de un único pico de actividad de uro-
quinasa.

Bien entendido, la composición a base de la sola
15 uroquinasa II que no contiene prácticamente ya "contami-
nación" por la uroquinasa I, puede ser objeto, si es preciso,
de una purificación suplementaria con vistas a eliminar
el máximo de proteínas extrañas e incrementar su actividad
específica en uroquinasa, y esto particularmente hasta la
20 obtención de una composición a base de uroquinasa II que
tenga una pureza suficiente para permitir su utilización en
terapéutica. Ejemplos de tales purificaciones se indicarán
en los ejemplos que siguen.

Como se ha indicado ya anteriormente, las dos frac-
25 ciones de uroquinasa separadas por el procedimiento de acuer-
do con la invención, presentan variaciones al nivel de sus
actividades enzimáticas frente a diferentes substratos, tan-
to si se trata de substratos sintéticos como si éstos son
naturales, o frente a diferentes formas de plasminógeno, par-
30 ticularmente los metionil- ó lisil-plasminógenos, por una

1 parte, y el glutamil-plasminógeno, por otra parte. Estas
diferencias han sido comprobadas por la utilización de las
tres técnicas de dosificación que constituyen:

- 5 - la técnica de la placa de fibrina según PLOUG y
KJELDJAARD [Ploug, J. Kjeldgaard, N.O., Biochim.
Biophys. Acta 24, 278-282 (1957)];
- la técnica sobre coágulo de fibrina según los
mismos autores [Ploug, J. Kjeldgaard, N.O., Bio-
chim. Biophys. Acta, 24, 278-282 (1957)];
- 10 - la técnica sobre substrato sintético AGLME según
WALTON [Walton, P.L., Biochim. Biophys. Acta 132,
104-114 (1967)].

Todas estas dosificaciones se han efectuado con
referencia a un patrón CTA oficial del "Comité para los
15 agentes trombolíticos", del Instituto Nacional del Corazón,
en los Estados Unidos (Committee on Thrombolytic Agents,
National Heart Institute).

Se han utilizado dos tipos de plasminógeno. El pri-
mero es del tipo del de los plasminógenos que está presente
20 normalmente en el plasma circulante en el hombre. Este plas-
minógeno está constituido esencialmente por glutamil-plas-
minógeno, es decir por un compuesto del tipo plasminógeno
activable en plasmina por la uroquinasa y cuyo ácido amina-
do terminal que posee un grupo amino libre está constituido
25 por el ácido glutámico.

El segundo tipo de plasminógeno puede ser conside-
rado como derivado de un glutamil-plasminógeno que ha per-
dido un péptido que comprende el susodicho ácido aminado
terminal constituido por el ácido glutámico. Los plasminó-
30 genos del segundo tipo, designados en lo que sigue, para co-

1 modidad de la exposición, por la expresión "plasminógenos
modificados" tienen en común con el glutamil-plasminógeno
el ser activables en plasmina, bajo el efecto de un activador
tal como la uroquinasa, por desdoblamiento de un enlace de
5 arginil-valina en sus moléculas.

Es sabido que se pueden obtener cantidades impor-
tantes de plasminógenos modificados, más particularmente
metionil- y lisil-plasminógenos -es decir plasminógenos cu-
yos ácidos terminales que contienen una función amina libre
10 están constituidos por la metionina y la lisina- a partir de
placentas humanas, por el procedimiento descrito, particu-
larmente en el artículo de Jean-Claude LORMEAU y colabora-
dores, titulado "Purificación y propiedades de los plasmi-
nógenos extraídos de la placenta humana", publicado en los
15 "Annales Pharmaceutiques Françaises", 1976, 34, nº 7-8,
págs. 287-296.

Como han comprobado igualmente los autores citados,
el glutamil-plasminógeno no se fija apenas sobre coágulos de
fibrina. Por el contrario, los plasminógenos modificados
20 pueden fijarse sobre coágulos de fibrina.

En lo que concierne más particularmente al compor-
tamiento de las uroquinasas purificadas según la presente
invención con respecto a estos diversos tipos de plasminó-
geno, se ha recurrido a la técnica de dosificaciones sobre
25 coágulo de fibrina de PLOUG [Ploug, J.KJELDJAARD, N.O., Bio-
chim. Biophys. Acta, 24, 278-282 (1957)], habiéndose modifi-
cado sin embargo esta técnica como sigue: una vez añadido
el plasminógeno estudiado (lisil- ó glutamil-plasminógeno)
al fibrinógeno, a razón de 4 mg de plasminógeno por 100 mg
30 de fibrinógeno, se ha medido la variación de los tiempos

1 de lisis de un coágulo formado por adición de trombina a 1
-ml de este fibrinógeno, en presencia de cantidades crecien-
tes de las uroquinasas ensayadas.

5 Las diferentes técnicas de dosificación que se han
utilizado, han permitido así demostrar que la uroquinasa II
tiene actividades del mismo orden de magnitud sobre coágu-
lo de fibrina y sobre el substrato AGLME, en tanto que la
fracción que contiene la uroquinasa I tiene una actividad
sobre coágulo de fibrina aproximadamente tres veces más ba-
10 ja que sus actividades sobre placa de fibrina y sobre el
coágulo AGLME.

Con respecto a los compuestos de tipo plasminógeno,
se ha constatado que si la uroquinasa I y la uroquinasa II
tienen la misma actividad con respecto al lisil-plasminóge-
15 no, la uroquinasa II presenta netamente ventaja en lo que
se refiere al glutamil-plasminógeno. En efecto:

1º) la uroquinasa II es 2,5 veces más activa que
la uroquinasa I con respecto al glutamil-plasminógeno;

2º) la uroquinasa II es tan activa con respecto al
20 glutamil-plasminógeno como en lo que se refiere al lisil-plas-
minógeno.

Por lo demás, se ha constatado que la uroquinasa II
corta de manera específica las cadenas del plasminógeno al
nivel del enlace arginil-valina arriba mencionado. La frac-
25 ción obtenida por el procedimiento de acuerdo con la inven-
ción, que contiene la uroquinasa I, es menos específica y
produce cortes en otros puntos de la molécula. Estas compro-
baciones se han hecho, particularmente por puesta en contac-
to de las uroquinasas a estudiar con el plasminógeno durante
30 períodos de tiempo variables (de 15 minutos a 24 horas) y

1 por análisis de los productos obtenidos por electroforesis
sobre gel de poliacrilamida.

5 Finalmente, se ha constatado que 60.000 uCTA de
uroquinasa II tienen una actividad lítica equivalente a la
de 100.000 uCTA de uroquinasa I, con respecto a coágulos
previamente formados a partir de diferentes substratos hu-
manos (sangre total, plasma rico en plaquetas, o desprovis-
to de ellas). Estos resultados se han obtenido en ensayos
orientados a la determinación por trombo-elastografía de
10 la dosis de cada una de dichas uroquinasas, que es capaz de
inducir la lisis completa de tales coágulos, preformados en
condiciones experimentales idénticas, en un tiempo compren-
dido entre 10 y 15 minutos.

15 De estas comprobaciones se deducen consecuencias
importantes al nivel de la aplicación de la uroquinasa II
en terapéutica, particularmente para tratamientos trombo-
líticos.

20 En efecto, la utilización en tratamientos trombo-
líticos de la uroquinasa II, está indicada particularmente
en razón de su capacidad de activación tan elevada frente
al glutamil-plasminógeno, es decir el plasminógeno natural
circulante, como frente a los plasminógenos modificados. De
ello resulta como consecuencia una posibilidad de aumento
notable de la actividad trombolítica, que autoriza una dis-
25 minución de las dosis que se utilizan en los tratamientos
actuales con mezclas de uroquinasas I y II, y más particu-
larmente con aquéllas en las que predomina la uroquinasa I.

30 La disminución de las dosis de uroquinasa neces-
arias no se traduce sólo en una ventaja económica, sino más
más todavía y sobre todo en una reducción de los efectos se-

1 cundarios bien conocidos que pueden entrañar los tratamien-
tos con uroquinasa.

5 El más amplio espectro de actividad y la mayor se-
lectividad de acción con respecto a los plasminógenos de la
uroquinasa II, y la menor actividad verosímil que resulta
de ello sobre los otros factores de coagulación, hacen de
aquella un medicamento perfeccionado de valor particular-
mente importante, hasta tal punto que su utilización puede
mantenerse incluso en los pacientes sometidos a una inter-
vención quirúrgica, sin aumento de los riesgos hemorrágicos.

10 Conviene observar que en el caso de ciertos trata-
mientos con la uroquinasa II, puede ser deseable también
prever una administración de un plasminógeno modificado,
previamente a la de la uroquinasa II. Naturalmente, esta ad-
ministración previa de plasminógeno modificado se justifica
15 en tales casos, no por una mayor rapidez de acción de la
uroquinasa, sino por las mayores cantidades de plasminógeno
activable in situ en los trombos.

20 Merece observarse, por último, que el procedimien-
to de acuerdo con la invención permite obtener uroquinasas
purificadas de factor muy alto, particularmente composicio-
nes a base de uroquinasa II que contienen al menos 100.000
uCTA/mg de proteína, cualquiera que sea el substrato utiliza-
do para la dosificación. La invención se refiere igualmente
25 a los medicamentos formados con tales uroquinasas.

Características suplementarias de la invención apa-
recerán aún en el curso de la descripción que sigue de ejemplos
de aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención.

30 La mezcla inicial de las uroquinasas I y II es la
que se obtiene a partir de orinas humanas y por el procedi-

1 miento descrito en la patente nº 71 34435 del 24 de sep-
tiembre de 1971. Dicha mezcla representa 20 millones de uni-
dades CTA de uroquinasa, teniendo una actividad específica
de 40.000 uCTA/mg de proteínas.

5 En los ejemplos que siguen, la dosificación de las
proteínas se efectúa por la técnica de LOWRY (J. Biol. Chem.,
1951, 193. pág. 265), recurriendo a una mezcla de albúmina
y de gammaglobulina como patrón.

10 Los pesos moleculares se determinan por valoración
sobre el gel conocido bajo la designación comercial SEPHADEX
G100, en el seno de tampones de sulfato de amonio 0,25 M, de
pH 5. Las determinaciones de los pesos moleculares de los
tipos de uroquinasa se hacen utilizando, como sustancias
de referencia, la albúmina (PM 67.000), la ovoalbúmina
15 (PM 45.000), el cromotripsinógeno (PM 25.000) y la mioglo-
bina (PM 17.800).

Las determinaciones de las actividades de uroquina-
sa se hacen según las técnicas cuyas referencias se han in-
dicado ya anteriormente en esta memoria.

20 Todas las operaciones de separación que se descri-
birán se efectúan a +4°C.

Las figs. 1 y 2 contienen las curvas representati-
vas de los contenidos, en los dos ejemplos que se indican
más adelante, de las diferentes fracciones en proteínas, ex-
presados por las densidades ópticas medidas a 280 nanómetros
25 (D.O. 280 nm, en el eje de ordenadas) y las actividades de
uroquinasa de estas mismas fracciones, dosificadas sobre
placa de fibrina y expresadas en superficies de lisis, en
milímetros cuadrados (AUK, mm², en el eje de ordenadas), en
función del número (N) de las fracciones eluidas sucesiva-
30

1 mente.

EJEMPLO I

5 Una columna de 2,6 cm de diámetro por 10 cm de altura, que contiene 50 ml de CM-SEPHAROSE se pone en equilibrio con tampón de sulfato de amonio 0,04 M, de pH 6,0 (volumen de tampón utilizado, 400 ml).

La mezcla de uroquinasa arriba indicada se disuelve en 100 ml de tampón de equilibrio, y la solución se dializa 8 horas contra 15 litros de este mismo tampón.

10 Los 180 ml de dializado obtenidos se centrifugan 10 minutos a 10.000 g, con el fin de eliminar la pequeña cantidad de producto insoluble formada en el curso de la diálisis.

15 La solución clara obtenida se somete luego a percolación a través de la columna, a un caudal de 25 ml/hora. La columna se lava a continuación con tampón de equilibrio, hasta ausencia de proteínas en el efluente (volumen de tampón utilizado: 320 ml). Aquélla se revela seguidamente con un gradiente lineal producido por dos depósitos, el primero de los cuales contiene 1 litro de tampón de sulfato de amonio 0,04 M, de pH 6,0, conteniendo el segundo 1 litro de tampón de sulfato de amonio 0,25 M, de pH 6,0. El efluente de la columna se recoge en los tubos de un colector de fracciones de 20 ml y su contenido de proteínas se analiza continuamente.

25 La curva A es representativa de las variaciones del contenido en proteínas y la curva B de la variación de la actividad de uroquinasa de las fracciones sucesivas, en total 40 fracciones, que han sido eluidas (fig. 1).

30 Los números sucesivos de las fracciones se indican

1 sobre el eje de las abscisas de la fig. 1.

Los tubos nº 8 a 18 del colector de fracciones se reagrupan y constituyen la fracción UK I. Los tubos nº 24 a 37 constituyen la fracción UK II. Los tubos nº 19 a 23 constituyen la fracción UK III.

La fracción UK III, constituida por una mezcla de las fracciones UK I y UK II, se desecha; las fracciones UK I y UK II tienen las características analíticas que se indican en la tabla I a continuación.

10

TABLA I

	<u>UK I</u>	<u>UK II</u>
Volumen	220 ml	280 ml
Proteínas	160 mg	375 mg
Actividad sobre AGLME	1,5 millones uCTA	16 millones uCTA
15 Actividad sobre placa de fibrina	1,5 millones uCTA	19 millones uCTA
Actividad sobre coágulo de fibrina	0,5 millones uCTA	19 millones uCTA
Peso molecular de la uroquinasa contenida en la fracción	33.000	54.000
20 uCTA (sobre AGLME) necesarias para producir en 1 hora la lisis de un coágulo formado a partir de 1 ml de plasma	200 uCTA	80 uCTA

EJEMPLO II

25

Una columna de carboximetil-SEPHAROSE (CM-SEPHAROSE CL 6 B) (26 mm x 100 mm) se pone en equilibrio por medio de un tampón de sulfato de amonio 0,04 M de pH 6,0. La uroquinasa se carga en la columna a un caudal de 30 ml/hora.

30

Después de ello, la columna se enjuaga por medio de tampón 0,04 M de pH 6,0 hasta ausencia de proteínas en el efluente.

1 Aquélla se revela seguidamente con un gradiente lineal pro-
ducido por dos depósitos, el primero de los cuales contiene
1 litro de tampón de sulfato de amonio 0,04 M, de pH 6,0,
conteniendo el segundo 1 litro de tampón de sulfato de amo-
5 nio 0,25 M de pH 6,0. El efluente de la columna se recoge
en fracciones de 18 ml.

Las curvas a y b son, como en el caso del ejemplo
anterior, respectivamente representativas de la concentra-
ción en proteínas (curva a) y de la actividad de uroquinasa
10 (curva b) de las diferentes fracciones separadas cuyos núme-
ros se indican sobre el eje de abscisas.

La recta c de la fig. 2 es en sí misma representa-
tiva del gradiente de sulfato de amonio expresado en "mola-
15 ridad de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ".

Como en el ejemplo anterior, las curvas de la fig.
2 hacen ver que la actividad de uroquinasa se separa en dos
fracciones netas.

Los tubos 13 y 22 se reagrupan (fracción I), así
como los tubos 30 a 48 (fracción II). Los tubos 23 a 29,
20 que representan 20% de la actividad depositada sobre la co-
lumna, pero susceptibles de contener una mezcla de las frac-
ciones I y II, se desechan.

Estas fracciones se concentran por precipitación
con sulfato de amonio (500 g/litro) de pH 5, y redisolución
25 del precipitado en un mínimo de agua destilada.

Las características analíticas de las fracciones
I y II se indican en la tabla II a continuación.

1

TABLA IICaracterísticas de las fracciones I y II

	<u>Fracción I</u>	<u>Fracción II</u>
Volumen	198 ml	472 ml
5 Actividad sobre AGIME	9830 uCTA/ml	25400 uCTA/ml
Actividad sobre placa de fibrina	11870 uCTA/ml	42500 uCTA/ml
Actividad sobre coágulo de fibrina	3050 uCTA/ml	31660 uCTA/ml
Proteínas	0,90 mg/ml	0,6 mg/ml
10 Porcentaje de la actividad depositada sobre la columna	11%	60%

15

Con el fin de permitir el estudio de los comportamientos enzimáticos de las uroquinasas obtenidas en las fracciones I y II, éstas son objeto de purificaciones suplementarias en condiciones idénticas para cada una de estas dos fracciones.

20

Una primera purificación consiste en una filtración sobre el gel conocido bajo la designación ULTROGEL ACA 4/4 de cada una de estas fracciones en el seno de una solución tamponada de sulfato de amonio 0,25 M, de pH 5,0. La filtración se ha efectuado en una columna de 5 cm x 1 m, y el efluente se ha recogido en fracciones sucesivas de 7 ml. Como en el caso anterior, se han reagrupado aquéllas de las fracciones eluidas que contienen la actividad de uroquinasa. Las fracciones reagrupadas se designan en la tabla III a continuación bajo los encabezamientos "fracción I_A" y "fracción II_A".

25

30

1

TABLA IIICaracterísticas de las fracciones I_A y II_A

	<u>Fracción I_A</u>	<u>Fracción II_A</u>
Volumen	123 ml	100 ml
5 Actividad sobre AGIME	6830 uCTA/ml	33570 uCTA/ml
Actividad sobre placa de fibrina	6510 uCTA/ml	35100 uCTA/ml
Actividad sobre coágulo de fibrina	1970 uCTA/ml	43950 uCTA/ml
Proteínas	0,06 mg/ml	035 mg/ml

10

Una purificación todavía más profunda se ha obtenido por cromatografía de afinidad en las condiciones indicadas a continuación.

15

La matriz de afinidad utilizada estaba formada por un material macromolecular a base de agarosa, que contenía grupos de un inhibidor de la uroquinasa, la para-aminobenzamida, estando unida ésta al material molecular por enlaces covalentes, por intermedio de cadenas lineales formadas por grupos lisil-succinilo.

20

La columna que contiene la matriz de afinidad (10 mm x 70 mm) se equilibra con tampón Tris-HCl 0,05 M de pH 7,5 - 0,5 M NaCl. La uroquinasa a purificar se disuelve en este tampón y se carga luego en la columna. La columna se enjuaga con este mismo tampón, y luego con tampón Tris-HCl 0,5 M; y 1 M NaCl, hasta ausencia de proteínas en el efluente. La uroquinasa se eluye con tampón glicocola-HCl 0,3 M, de pH 3,5 y se conserva como tal. Dicha uroquinasa puede ser después liofilizada.

25

30

Las fracciones I_B y II_B purificadas presentan las características analíticas que se indican en la tabla IV a

250478

1 continuación.

TABLA IV

Características de las fracciones I_B y II_B

	<u>Fracción I_B</u>	<u>Fracción II_B</u>
5 Actividad sobre AGLME (uCTA/mg de proteínas)	165.000	104.000
Actividad sobre placa de fibrina (uCTA/mg de pro- teínas)	170.000	128.000
10 Actividad sobre coágulo de fibrina (uCTA/mg de proteí- nas)	54.000	126.000

15 La tabla V contiene los resultados de las medidas de actividad de las uroquinasas de las fracciones I_B y II_B con respecto a dos tipos de plasminógeno. Las medidas se han efectuado recurriendo a la técnica de dosificación de PLOUG modificada.

20

25

30

TABLA V

Comparación de las actividades de las fracciones I_B y II_B sobre glutamil- y lisil-plasminógenos

Fracción	I _B						II _B									
	Glutamil-plasminógeno			Lisil-plasminógeno			Glutamil-plasminógeno			Lisil-plasminógeno						
uCTA (dosificadas sobre AGIME)	3	4,5	6	7,5	3	4,5	6	7,5	3	4,5	6	7,5	3	4,5	6	7,5
Tiempo de lisis (en minutos y segundos)	16'35"	12'55"	11'05"	9'30"	9'30"	7'55"	6'40"	6"	9'	7'35"	6'45"	6'10"	9'	7'45"	6'20"	5'55"

1 Por el examen de esta tabla, se puede constatar que
la actividad de la uroquinasa II es sensiblemente la misma
con respecto al glutamil-plasminógeno que con respecto al
lisil-plasminógeno. Se comprueba asimismo que, a dosis igua-
5 les, la uroquinasa I y la uroquinasa II tienen actividades
equivalentes respecto al lisil-plasminógeno. Por último, se
puede ver que 3 uCTA de la uroquinasa II tienen frente al
glutamyl-plasminógeno una actividad del mismo orden de mag-
nitud que la de 7,5 uCTA de uroquinasa I.

10 La invención concierne por tanto igualmente a com-
posiciones farmacéuticas a base de uroquinasa II, exentas
de uroquinasa I, en las cuales estas uroquinasas se encuen-
tran asociadas a vehículos que permiten su administración.
Con preferencia, aquéllas se presentan en la forma de solu-
15 ciones isotónicas estériles, susceptibles de ser administra-
das por inyección, perfusión o por intermedio especialmen-
te de catéteres en proximidad inmediata del trombo o de los
trombos cuya lisis se desee.

20 A título indicativo, se señala que para el trata-
miento de las embolias pulmonares, se puede recurrir sea
a una perfusión general lenta, sea a la administración lo-
cal directa en el sistema arterial pulmonar con catéter,
particularmente catéter de angiopneumografía, de la canti-
dad de uroquinasa o "bolo" requerida por el tratamiento trom-
25 bolítico.

Esquemas de posología que pueden utilizarse son
los siguientes.

Las dosis de uroquinasa II a administrar se sitúan
particularmente dentro de los intervalos que se indican a
30 continuación.

1 Administración lenta por perfusión: de 75.000 a 120.000,
por término medio del orden de 112.000 uCTA/hora
durante 24 horas;

5 Administración por catéter in situ en contacto con el trombo
de un bolo, particularmente de 800.000 a 1.000.000
de uCTA, administrado en 10 minutos.

10 Como es evidente, y como resulta ya por otra parte
de lo que antecede, la invención no se limita de ningún modo
a aquéllos de sus modos de aplicación y de realización que
se han examinado más especialmente; aquélla abarca, por el
contrario, todas las variantes.

15

20

25

30

250478

1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

1ª.- Un procedimiento de separación de dos tipos de uroquinasa, una uroquinasa de peso molecular del orden de 54.000 (uroquinasa II) y una fracción que contiene la uroquinasa de peso molecular del orden de 33.000 (uroquinasa I), caracterizado por el hecho de que el mismo comprende las etapas que consisten en poner en contacto con una resina cambiadora de iones, sobre la cual son susceptibles de fijarse las uroquinasas, la mezcla de uroquinasas a separar en el seno de una solución tamponada a base de una sal mineral del tipo de aquéllas que, a una concentración dada, permiten la retención o la fijación de los dos tipos de uroquinasa sobre la resina, cuando ésta está en equilibrio con una tal solución tamponada, lavar a continuación dicha resina, especialmente con la misma solución tampón hasta que el efluente no contiene ya proteínas, hacer pasar sobre la resina, en la cual están fijadas las uroquinasas, una solución tampón análoga excepto que se hace variar progresivamente su concentración en sal mineral a partir del valor inicial tal como se define arriba hasta el valor para el cual ya no puede quedar retenido ningún tipo de uroquinasa sobre la resina, en condiciones de revelado apropiadas pa-

15

20

25

30

1 ra permitir las eluciones sucesivas, pero separadas, de los
dos tipos de uroquinasa.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª, caracterizado por el hecho de que se recoge la
5 fracción que contiene la uroquinasa II.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª ó 2ª, caracterizado por el hecho de que la resi-
na utilizada es a base de una agarosa cuyas cadenas están
reticuladas entre sí, con preferencia una resina de este
10 tipo que contiene grupos carboximetilo, tal como la conoci-
da bajo la designación "carboximetil-SEPHAROSE^R".

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquie-
ra de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado por el
hecho de que la mezcla de uroquinasas inicialmente emplea-
da tiene una actividad específica en uroquinasa al menos
15 igual a 5000 uCTA/mg de proteínas, con preferencia igual
o superior a 8000 uCTA/mg de proteínas.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquie-
ra de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado por el
20 hecho de que la solución tamponada tiene un pH comprendido
entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7, con preferen-
cia del orden de 6, y la sal mineral cuya concentración se
hace variar está constituida por el sulfato de amonio, es-
tando comprendida la concentración inicial en esta sal que
25 permite la fijación de las uroquinasas sobre la resina entre
aproximadamente 0,01 M y 0,06 M, particularmente del orden
de 0,04 M y 0,06 M, especialmente del orden de 0,04 M, y es-
tando comprendida la concentración final en esta sal, al
término de la elución de las uroquinasas fijadas sobre la
30 resina, entre aproximadamente 0,1 y 0,5 M, con preferencia

1 del orden de 0,25 M.

5 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5ª, caracterizado por el hecho de que se emplea un volumen de resina o gel cambiador de iones, a razón de 1 ml de resina o gel para 0,1 a 1.000.000 de uCTA de uroquinasa.

7ª.- Un procedimiento de separación de dos tipos de uroquinasa.

10 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.

Esta Memoria consta de VEINTICINCO hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 03.MAY.1978

15

P.A.

Oscar de Elizaburu
Por Poder.



20

25

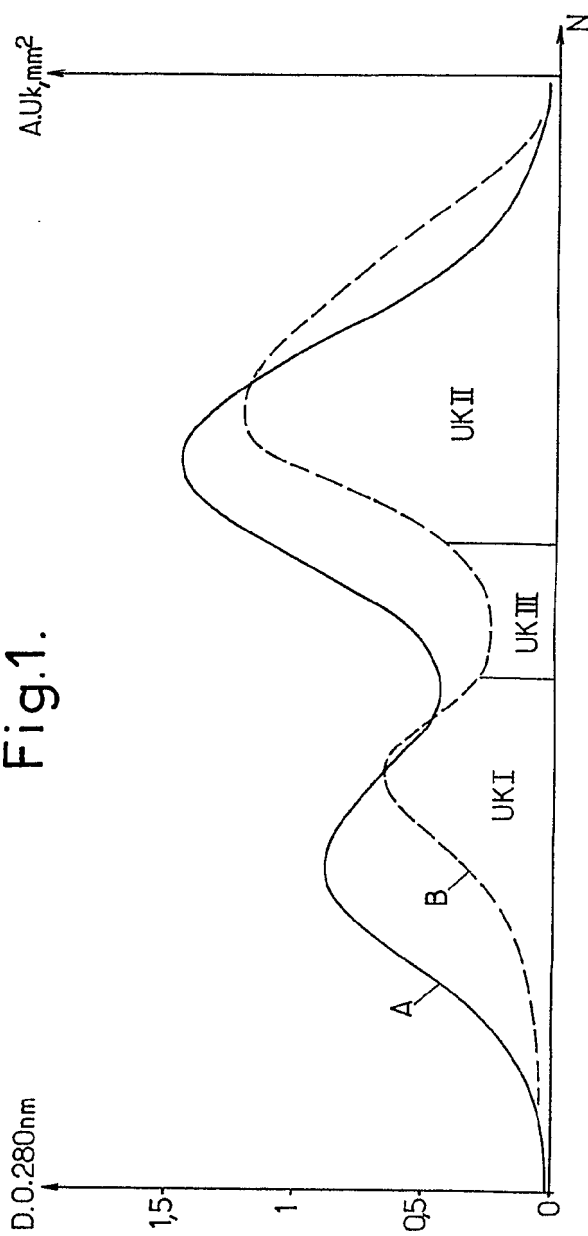


30

250478

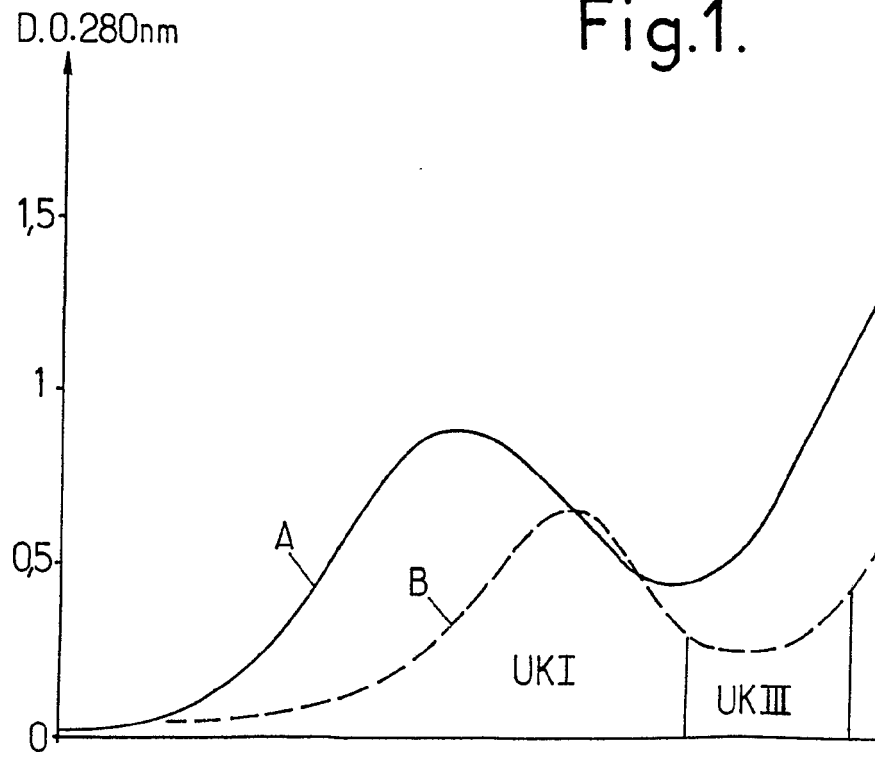
VAL

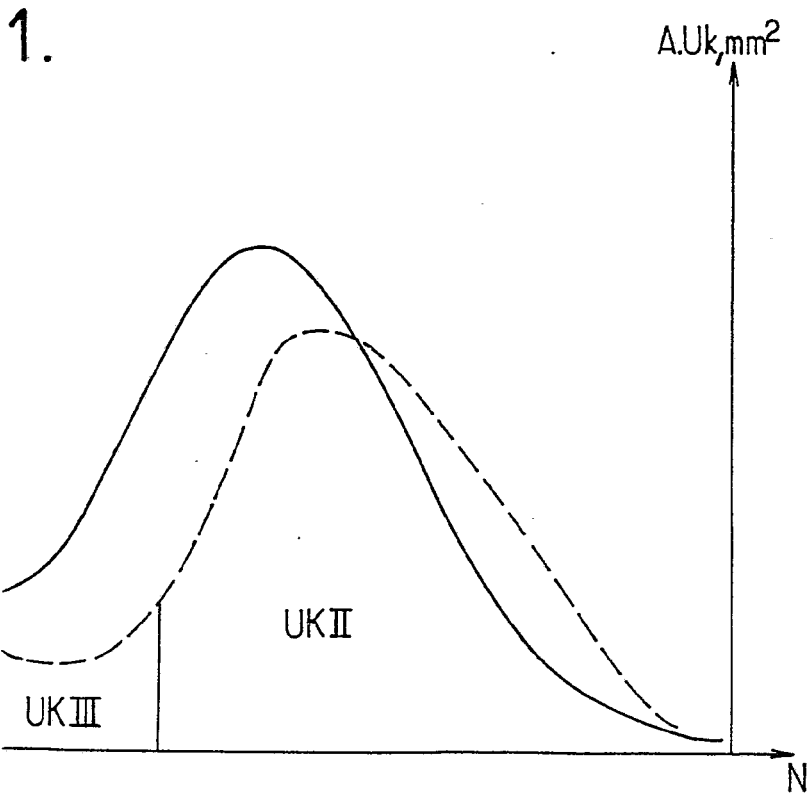
Fig.1.

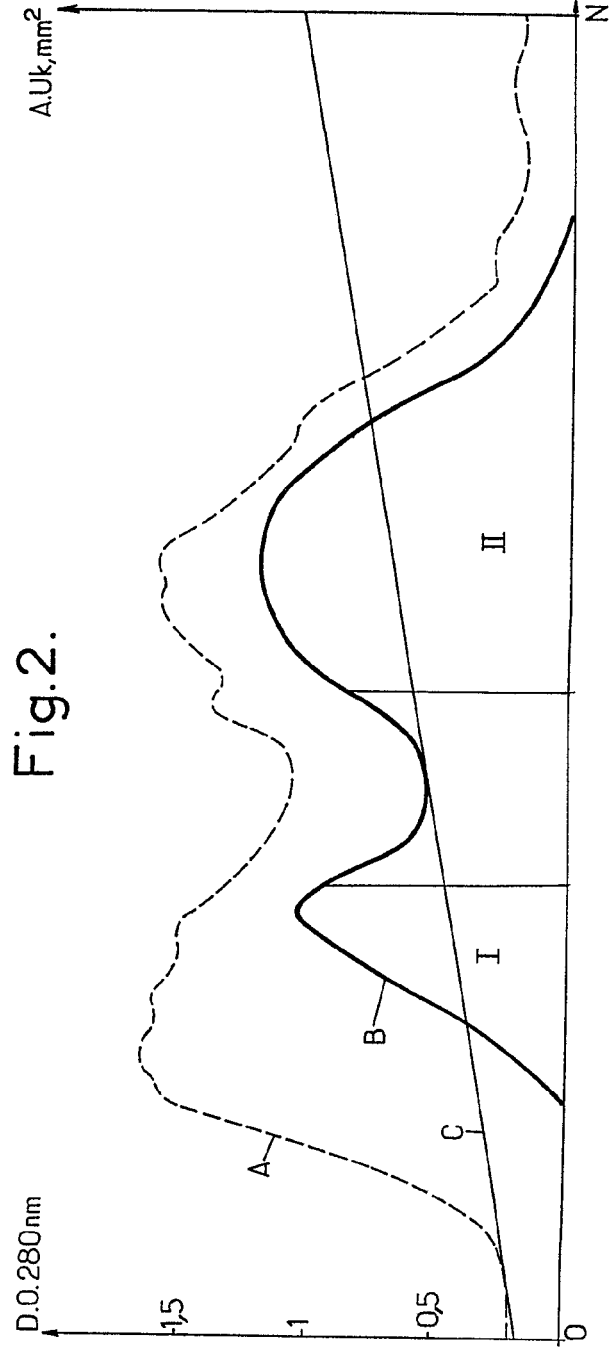


Osaka de Elzabur
Per Pelen.
[Signature]

Fig.1.







OSCAR BACHURS
Per Foto.

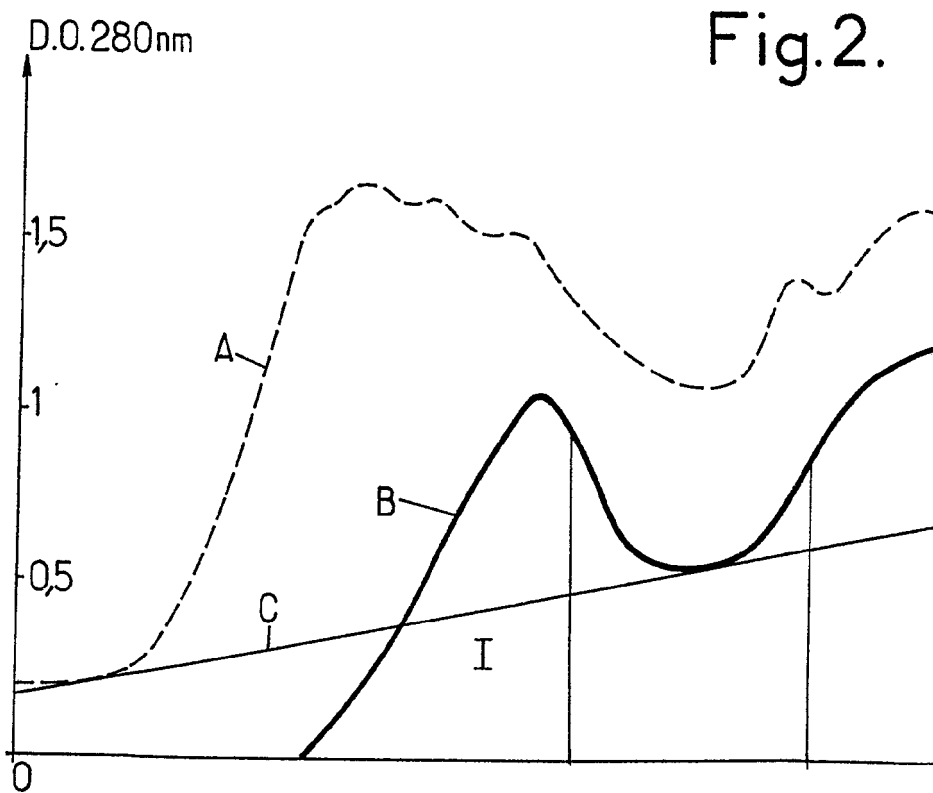
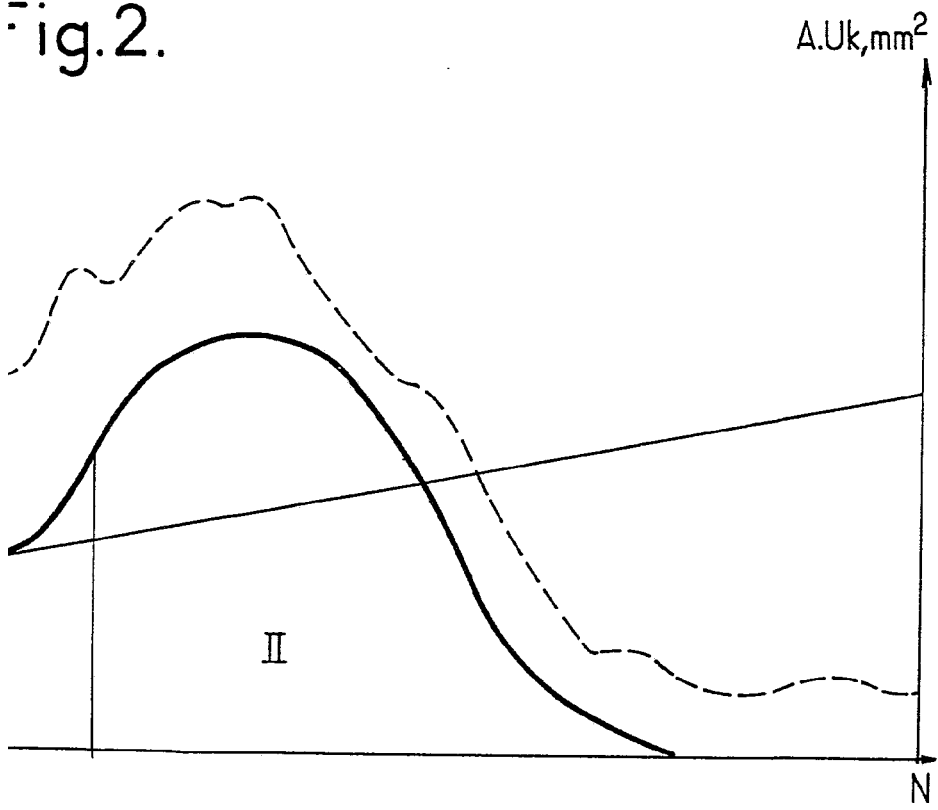


Fig. 2.



Oscar de Eizghuru
For Power.