

NUMERO	476.282
FECHA DE PRESENTACION	22-12-78



ESPAÑA

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

**PATENTE DE INVENCION**

<p>30 PRIORIDADES:</p> <p>31 NUMERO</p>	<p>32 FECHA</p>	<p>33 PAIS</p>
-----------------------------------------	-----------------	----------------

<p>47 FECHA DE PUBLICIDAD</p>	<p>51 CLASIFICACION INTERNACIONAL</p> <p>C07G 7/036</p>	<p>52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA</p>
-------------------------------	---------------------------------------------------------	---------------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO MEJORADO DE RECUPERAR UROQUINASA DE UNA ORINA RECIENTE O UNA SOLUCION DE UROQUINASA BRUTA"

71 SOLICITANTE (S)

THE GREEN CROSS CORPORATION (A3464-12 CROSS)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1-47, Chuo-1-chome, Joto-ku, Osaka, Japon

72 INVENTOR (ES)

Tadakazu Suyama

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 70.797)

MCG.

Este invento se refiere a un método de recuperar uroquinasa de una orina reciente o una solución de uroquinasa bruta, y es aplicable también a la producción de una preparación o preparado trombolítico que contiene como constituyente principal uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000  $\pm$  10.000.

La uroquinasa es una enzima que existe en cantidades pequeñas en la orina humana y tiene una función de activar el plasminógeno contenido en el suero formando plasmina que tiene actividad fibrinolítica. Siendo un activador eficaz para el sistema fibrinolítico, la uroquinasa se aísla de la orina humana o de cultivos de tejidos de riñones y se purifica para ser empleada clínicamente de forma amplia en el tratamiento de diversas trombosis, cánceres, en combinación con agentes carcinostáticos y otras enfermedades.

Así, la uroquinasa ha llegado a ser muy útil en el campo farmacéutico. Los autores del presente invento realizaron estudios para promover la utilización más eficaz de la uroquinasa en su empleo terapéutico. Las preparaciones de uroquinasa empleadas corrientemente como compuestos farmacéuticos son mezclas de pesos moleculares diferentes. Se conocen dos tipos de uroquinasa, una que tiene un peso molecular alrededor de 33.000  $\pm$  10.000 y otra que tiene un peso molecular de alrededor de 54.000  $\pm$  10.000. Estas se mezclan de forma que muestran una potencia definida. Aunque la razón no ha sido todavía decidida, la existencia de enzimas de diferente peso molecular en la uroquinasa se presume que es atribuible a la existencia de isozimas debido a la diferencia en los tejidos que producen enzimas, la transformación en sub-unidades por la acción de enzimas proteolíticas u orina u otros materia-

les, o la descomposición o modificación durante la recuperación de la orina.

Es presumible que las preparaciones de uroquinasa que tienen diferentes pesos moleculares presentarán naturalmente diferente eficacia fisiológica. Sin embargo, no se han obtenido ni suficientes indicaciones sobre dicho problema ni informaciones sobre la diferencia significativa en la eficacia del ensayo convencional in vitro por el método de revestimiento con fibrina o por el método de dos etapas [Pharmaceuticals Research, 5 (3), 295-308 (1974)] que se ha llevado a cabo generalmente para normalizar la actividad enzimática de las preparaciones de uroquinasa. Por consiguiente, al administrar la preparación de uroquinasa, se ha realizado la normalización ajustando la potencia total por el ensayo in vitro. En otras palabras, la uroquinasa se administró en la suposición de que su eficacia fisiológica es la misma si la actividad enzimática (potencia) in vitro es la misma, a pesar de la diversidad de peso molecular de la uroquinasa.

Bajo las circunstancias anteriores de la técnica, se aclaró la diversidad del peso molecular de las preparaciones de uroquinasa y se ampliaron los ensayos en animales así como los usos clínicos de la uroquinasa. Justo al mismo tiempo, los inventores del presente invento encontraron que existe una diferencia significativa entre la actividad in vitro y el comportamiento in vivo de la uroquinasa dependiendo del peso molecular.

Partiendo del descubrimiento anterior, los autores del presente invento examinaron además si la actividad enzimática in vitro refleja exactamente la eficacia

enzimática in vivo, si la uroquinasa de diferente peso molecular presenta la misma eficacia biológica in vivo, y si existe o no otra diferencia enzimológica dependiendo de la diferencia en el peso molecular. Como resultado, se encontró sorprendentemente que existía una diferencia bastante grande respecto a la actividad trombolítica entre las muestras que han sido ajustadas a la misma potencia basada en la actividad enzimática ensayada por el método de dos etapas u otros métodos in vitro y que existe una cierta interrelación entre el peso molecular y la actividad trombolítica de la uroquinasa. Se encontró que la uroquinasa con un peso molecular mayor presentaba un efecto trombolítico más elevado incluso si la potencia determinada in vitro por el método de dos etapas u otro método era la misma. Se encontró además que la uroquinasa con peso molecular superior es superior también en conservación.

Grupos de sabuesos fueron administrados intravenosamente con uroquinasa de peso molecular superior (54.000) y uroquinasa de peso molecular inferior (33.000) respectivamente, se marcó cada uno con  $^{125}\text{I}$  y se siguió la atenuación de cada uroquinasa en la sangre. Se encontró que la uroquinasa de peso molecular superior permanece mayor tiempo en la sangre y su vida media alcanza alrededor del doble que la de peso molecular inferior.

En los dibujos que se acompañan, la Figura 1 es un diagrama que representa la relación entre el pH de una solución acuosa de uroquinasa y la relación de actividad residual; y la Figura 2 es un diagrama que representa la atenuación de uroquinasas de diferente peso molecular marcadas con  $^{125}\text{I}$  en la sangre de sabuesos después de la

inyección intravenosa.

Basado en los resultados de estudios realizados sobre la eficacia farmacéutica in vivo de la preparación de uroquinasa y en el método para recuperar dicha uroquinasa eficaz, los autores del presente invento han int  
5 tado desarrollar una nueva preparación de uroquinasa norma  
lizada que tenga una eficacia biológica elevada, que contiene uroquinasa de elevado peso molecular como constituyen  
te principal.

10 Un objeto de este invento es proporcionar un método para producir una preparación trombolítica que contenga uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000  $\pm$  10.000 como constituyente principal.

15 El método para producir uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000  $\pm$  10.000 no es específico a no ser que el rendimiento sea una cuestión importante. La uroquinasa puede aislarse de una forma conocida por diversas etapas de tratamiento incluyendo separación de la orina, concentración y purificación. La uroquinasa purificada se  
20 somete a un tratamiento empleado en separar y recuperar una enzima de peso molecular prescrito, tal como fracciona  
miento por filtración con gel, técnica de columna de inter  
cambio iónico, cromatografía por afinidad o precipitación fraccionada.

25 La filtración con gel es un método sencillo para recuperar uroquinasa de un peso molecular prescrito y da buenos resultados. Los materiales adecuados para la filtración con gel incluyen gel de dextrano reticulado, gel de poliacrilamida y gel de agarosa preparados para  
30 tratar una sustancia que tiene un peso molecular en el in

1 intervalo de 1.000 a 150.000. El material del filtro se man-  
tiene en una columna equilibrada con una solución tampón  
de sal inferior de pH 5,5 a 9,5. Una solución acuosa que  
5 contiene uroquinasa se desarrolla en la columna y se recu-  
pera la fracción que contiene uroquinasa que tiene un peso  
molecular de  $54.000 \pm 10.000$ . Dicho procedimiento es sen-  
cillamente un ejemplo y no es limitativo.

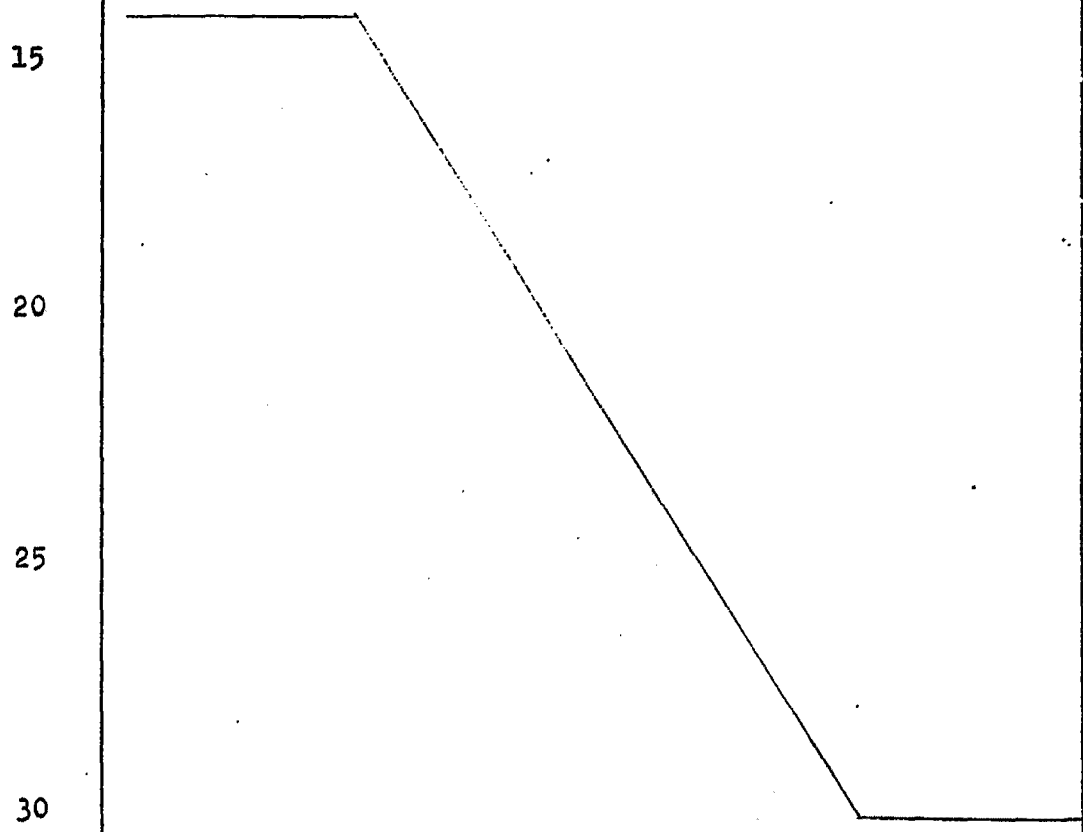
Los autores del presente invento han hecho es-  
tudios sobre la mejora del rendimiento de la uroquinasa que  
10 tiene un peso molecular de  $54.000 \pm 10.000$  y como resulta-  
do, encontraron que es eficaz para la mejora del rendimien-  
to mantener en cada etapa de tratamiento el pH de una so-  
lución acuosa que contiene uroquinasa dentro del intervalo  
de neutro a débilmente básico, preferiblemente de 5,5 a 12,  
15 particularmente en la etapa de diálisis para la eliminación  
de las sales. Cuando se satisface esta condición, se ase-  
gura la estabilidad de la uroquinasa y la uroquinasa que  
tiene un peso molecular esperado de  $54.000 \pm 10.000$  se re-  
cupera eficazmente sin que tenga lugar la descomposición.  
20 El ejemplo experimental 1 dado a continuación muestra el he-  
cho anterior.

#### Ejemplo experimental 1

25 La interrelación entre el pH y la relación de  
la actividad de uroquinasa residual así como la distribu-  
ción del peso molecular:

Uroquinasa que había sido recuperada de orina  
humana por adsorción en gel de sílice se fraccionó con sul-  
fato de amonio y la solución extracto se ajustó a una po-  
30 tencia de uroquinasa de 9.800 UI. La solución resultante

se dializó durante 40 horas a 4°C frente a un líquido exterior de agua, una solución tampón de acetato de sodio 1M de pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 11,0 o 12,0 o una solución tampón de fosfato 1/15 M, renovando mientras el líquido exterior en un intervalo de tiempo de 8 horas. Después de completar la diálisis, se analizó la relación de la actividad residual y se evaluó de modo aproximado la distribución del peso molecular mediante un tamiz molecular por medio de una técnica de filtración con gel. La relación de la actividad residual encontrada y los resultados de la estimación del peso molecular en las fracciones de uroquinasa con referencia a muestras patrón de peso molecular conocido son como se resume en la Tabla 1.



19019

Tabla I.- Interrelación entre el pH y la relación de actividad residual así como la distribución del peso molecular.

5

10

15

20

Expe- rimen to nº	pH del líquido exterior	Actividad después de la diálisis	Relación de acti- vidad re sidual	Distribución del peso molecular	
				$33.000 \pm$ $\pm 10.000$	$54.000 \pm$ $\pm 10.000$
Tes- tigo	Solución extracto	9.800	100	-	++
"	H <sub>2</sub> O	8.514	86	$\pm$	$\pm$
1	3	6.324	65	++	-
2	4	6.314	64	++	-
3	5	6.426	66	+	+
4	6	7.252	74	-	+
5	7	8.296	85	-	++
6	8	10.290	105	-	++
7	9	9.672	99	-	++
8	11	9.016	92	-	++
9	12	8.722	89	-	++

25

Nota: - ... No detectable;  $\pm$  ... detectable; + ... detec  
table en un grado considerable; ++ ... detectable en un  
grado suficientemente grande.

30

En la preparación de uroquinasa obtenida de la orina humana, existe la posibilidad de contener virus que causan hepatitis, enfermedades endémicas u otra clase de enfermedades. Con el fin de poder ser administrada al hombre como un compuesto farmacéutico, la uroquinasa debe experimentar el tratamiento para inactivación de virus, es decir, el conocido tratamiento con calor (55°C a 65°C durante 9 a 11 horas) que es por el momento el más sencillo y más seguro. Durante el tratamiento con calor, también es eficaz para la estabilidad de la uroquinasa ajustar la solución de uroquinasa acuosa a un pH 6-8 con una solución tampón, 0,01 a 0,3 M en concentración de sal. Se obtiene un efecto estabilizador extremadamente alto frente al calor cuando está presente un estabilizador al calor seleccionado del grupo que consiste en proteínas, aminoácidos, sacáridos y sales neutras además de la condición de pH antes citada. Aunque no es crítica, la actividad específica de la uroquinasa es preferiblemente 200 o mayor, más preferiblemente 1.000 a mayor unidades internacionales (UI) por mg. La cantidad de uroquinasa en la solución que ha de tratarse con calor es generalmente 0,001 a 5% (P/V), preferiblemente 0,01 a 1% (P/V), en términos de proteínas. Es preferible mantener el pH de la solución que ha de tratarse con calor en 6 a 8 ajustándolo con una solución tampón, particularmente una solución tampón de fosfato, 0,01 a 0,3 M en concentración de sal.

En las condiciones anteriores, los estabilizadores al calor adecuados, si se emplean, son aminoácidos tales como blicina, lisina y arginina; sacáridos tales como sacarosa y manita; sales neutras tales como cloruro de

sodio; y proteínas tales como gelatina.

El límite inferior de la cantidad de estabilizadores que ha de añadirse es normalmente 5% para glicina, sacarosa y manita, 0,1 M para lisina y arginina, 0,15 M para cloruro de sodio y 0,1% en términos de proteínas para albúmina y gelatina. Incluso cuando la cantidad se reduce por debajo del límite inferior, el estabilizador no pierde su efecto bruscamente sino sólo gradualmente. No hay límite superior de la cantidad de estabilizador, a no ser que se tenga en cuenta la separación del estabilizador de la preparación.

La temperatura del tratamiento de inactivación de virus es 50° a 70°C, preferiblemente 55° a 65°C y el tiempo de calentamiento es de 8 a 12 horas. La uroquinasa tratada con calor, si es necesario, se libera de las sales y estabilizadores al calor por diálisis o similar. La uroquinasa muy purificada se divide en viales y se liofiliza obteniendo las preparaciones farmacéuticas. En el caso de uroquinasa bruta, se realiza de modo similar en preparaciones farmacéuticas después de haber sido muy purificada por empleo de intercambiadores de ion muy conocidos, adsorbentes específicos de uroquinasa o sepharose 4B.

Con el fin de examinar el efecto del calentamiento en el comportamiento infeccioso de los virus que tienen posibilidades de existir en la preparación de uroquinasa, se llevaron a cabo experimentos de calentamiento en presencia o ausencia de estabilizadores de calor. Los virus añadidos a la solución de uroquinasa acuosa eran virus de viruela, virus de paperas, virus de sarampión, virus de estomatitis vesicular, virus chikunguya, virus de en

1 cefalitis japonesa, virus de hepatitis B, virus de rubcola,  
poliovirus, coxsackievirus y eciovirus. El tratamiento con  
calor se llevó a cabo a 60°C durante 10 horas durante las  
cuales se ensayó el comportamiento infeccioso residual a  
5 intervalos regulares. Al cabo de 10 horas, el comporta-  
miento infeccioso se perdió completamente tanto si estaba pre-  
sente como si no el estabilizador de calor. Estos resulta-  
dos sugieren que el tratamiento de calor de acuerdo con este  
invento ejercerá un efecto de inactivación también sobre  
10 otros virus que los empleados en los experimentos anterio-  
res. A continuación se dan los ejemplos experimentales 2 y  
3 que sugieren los resultados anteriores.

#### Ejemplo experimental 2

15 Dependencia de la estabilidad de la uroquinasa  
sa en el tratamiento con calor sobre el pH:

Una solución tampón de fosfato se añadió en  
diversas concentraciones a una solución de uroquinasa acuo-  
sa [actividad específica, 15.000 UI/mg; concentración de  
20 proteínas, 0,02% (2/V)] para preparar muestras de solucio-  
nes de uroquinasa que tenían pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.  
Cada muestra se calentó a 60°C durante 10 horas y se compa-  
ró la actividad residual. Después del tratamiento con ca-  
lor, el estabilizador al calor se separó por diálisis y se  
25 midió la actividad de uroquinasa, calculando la relación  
de la actividad residual tomando la actividad específica  
antes del calentamiento como el 100%. Como se muestra en  
la Figura 1, la uroquinasa retuvo el 52%, el 65% y el 50%  
de las actividades iniciales a pH 6, 7 y 8, respectivamen-  
te, indicando que es eficaz el ajuste del pH de la solu-  
30

09038

**POOR  
QUALITY**

ción de uroquinasa acuosa en el intervalo de 6 a 8.

Ejemplo experimental 3

Efecto de los estabilizadores al calor:

5 En este ejemplo experimental 3, empleando diversos estabilizadores al calor, se comparó uno con otro cada efecto estabilizador frente al calor. Después de tratamiento con calor, se separó el estabilizador al calor, por diálisis y la relación de actividad residual se determinó tomando la actividad específica antes del tratamiento al calor como el 100%. Los resultados obtenidos fueron como se muestra en la Tabla 2. Los virus empleados en el experimento fueron los mismos que se han descrito en el Ejemplo experimental 2. En la Tabla 2, "testigo (1)" es el caso en el que estaba ausente el estabilizador al calor y que el pH se ajustó a 6,8 con una solución tampón de fosfato 0,1 M y "testigo (2)" es el caso en el que no se añadió solución tampón de fosfato y, por lo tanto, el pH no se ajustó. Las actividades de uroquinasa residuales fueron 20 65-75%, 78% y 79% en presencia de glicina, lisina y arginina, respectivamente, 75-78%, 78% y 71-75% en presencia de sacarosa, manita y cloruro de sodio, respectivamente, y 88-100% en presencia de gelatina, indicando que todas las sustancias son estabilizadores al calor eficaces. Cuando la solución de uroquinasa acuosa se ajustó a pH 6,8, la uroquinasa retuvo el 65% de la actividad inicial en ausencia de un estabilizador al calor, indicando que el ajuste de la solución de uroquinasa a pH 6 a 8 es eficaz para estabilizar la actividad.

30

TABLA 2

Estabilizador al calor		Relación de actividad de uroquinasa residual, %	Comportamiento infeccioso del virus residual
Tipo	Concentración, %		
Glicina	5	65	Ninguno
	10	70	
	15	75	
Lisina	0,1 M	78	"
Arginina	0,1 M	79	"
Sacarosa	5	75	"
	10	77	
	15	78	
Manita	5	73	"
	10	73	
Cloruro sódico	0,15 M	71	"
	0,3 M	75	
EDTA	0,1	23	"
Gelatina	0,5	88	"
	1,0	91	
	3,0	89	
Testigo (1) (solamente uroquinosa)	-	65	"
Testigo (2) (Sin solución tampón)	-	0	"

19019

1 Los ensayos de actividad trombolítica, la vi-  
da media en la sangre después de la administración intrave-  
nosa, estabilidad, toxicidad, dosis de administración y mo-  
do de administración in vitro e in vivo se realizaron en  
5 uroquinasa que tenía un peso molecular de  $54.000 \pm 10.000$ .  
Los métodos experimentales y los resultados se describen  
más adelante.

#### Ejemplo experimental 4

10 Determinación de la actividad trombolítica  
por el método de circuito de Chandler:

Se fraccionó uroquinasa purificada en frac-  
ciones que tenían, respectivamente, pesos moleculares de  
33.000  $\pm$  10.000 (33.000 para la mayor parte), 54.000  $\pm$   
15  $\pm$  10.000 (54.000 para la mayor parte), y alrededor de  
100.000. La fracción que tenía un peso molecular de alre-  
dedor de 100.000 se encontró en una cantidad muy pequeña y  
parecía que era un producto asociado de uroquinasa que te-  
nía un peso molecular de 54.000. La recuperación de esta  
20 fracción de la orina es comercialmente imposible. Cada  
fracción se disolvió en solución salina fisiológica prepa-  
rando las muestras siguientes de potencias variables: mues-  
tra (1), 18,75 UI/ml; muestra (2), 37,5 UI/ml; muestra (3),  
75,0 UI/ml; muestra (4), 150 UI/ml; muestra (5), 300 UI/ml  
25 y una muestra testigo (solución salina fisiológica).

La potencia en la unidad UI se determina por  
un método en dos etapas in vitro, que comprende dejar la  
preparación de uroquinasa bajo ensayo actuar en plasminó-  
geno purificado, empleado como sustrato, para formar plas-  
30 mina, descomponer a continuación la fibrina de sustrato

1 secundario por la acción de la plasmina así formada, y calcular la potencia a partir del tiempo de disolución de la fibrina [Pharmaceuticals Research, 5 (3), 295-308 (1974)].  
5 La relación entre la unidad UI y la unidad Plong convencional [B.B.A. 24, 278-282 (1975)] se expresa por 5.000 unidades Plong = 6.000 UI.

La formación del trombo y la determinación de la relación de disolución se llevaron a cabo del modo siguiente:

10 En una pieza de tubería plástica (de 3 mm de diámetro interior y 270 mm de longitud), se colocó 1 ml de sangre fresca que contenía 3,8% de un citrato y 0,1 ml de una solución de cloruro de calcio 0,25 N. El tubo se cerró herméticamente en ambos extremos formando un circuito.  
15 Se formó un trombo haciendo girar a 12 r.p.m. el tubo cerrado herméticamente durante 30 minutos a 37°C. En el circuito se inyectó una de las soluciones de muestra de uroquinasa o la muestra testigo. El tubo se hizo girar de nuevo a 12 r. p. m. durante 4 horas a 37°C. El trombo residual sacado del tubo se fijó durante una noche en una solución de Bovin (preparada mezclando juntos 75 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formalina comercial y 5 ml de ácido acético glacial), y el peso del trombo se determinó examinando la interrelación entre la  
20 potencia UI, el peso molecular y la actividad trombolítica. La actividad trombolítica de la uroquinasa se expresó en términos de relación en peso del peso medio del trombo del grupo que contiene uroquinasa al peso medio del trombo del grupo testigo (grupo de solución salina fisiológica). Esta  
25 relación se denomina en la presente memoria "relación trom-

30  
09038

POOR  
QUALITY

bolítica)(en %)" y se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación entre el peso molecular de uroquinasa y la relación trombolítica (%)

5

Peso molecular de uroquinasa	Muestra (1)	Muestra (2)	Muestra (3)	Muestra (4)	Muestra (5)
100.000	0	2	62	82	80
54.000	0	1	63	83	81
33.000	0	1	13	65	72

10

15

De los resultados mostrados en la Tabla 3, se encontró que la uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000 es excelente en actividad trombolítica, mientras que la uroquinasa que tiene un peso molecular de 33.000 tiene una actividad trombolítica tan pequeña como menos de la mitad de la uroquinasa de peso molecular elevado. Aunque el ensayo de la actividad trombolítica por el método del circuito de Chandler se lleva a cabo in vitro, se reconoce que es un método de ensayo sencillo y conveniente que se aproxima más que el ensayo in vivo [J. Exp. Physiol., Vol. XLIV (4), 377-384 (1959)] y se cree que es capaz de representar suficientemente el comportamiento de la uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000 ± 10.000 empleada en este invento.

20

25

30

Los resultados obtenidos antes mostraron un hecho sorprendente que las preparaciones de uroquinasa

5 evaluadas hasta ahora que tenían la misma potencia, según se ensayaron por el método del tubo de ensayo convencional, el método del recubrimiento o el método en dos etapas (Pharmaceutical Research, loc. cit.), presentando actividad trombolítica bastante diferente dependiendo del peso molecular de la uroquinasa.

#### Ejemplo experimental 5

Efecto trombolítico in vivo (en ratas):

10 Siguiendo el método de Y. Sasaki [Thrombosis Res., 9, 513 (1976)] y R.N. Chakravart [Atherosclerosis, 21, 349 (1975)], la acción fibrinolítica de la uroquinasa in vivo se examinó por empleo de ratas.

15 El fibrinógeno humano se marcó con  $^{125}\text{I}$  por el método de Greenwood y otros [Biochem. J. 89, 114 (1963)] preparando  $^{125}\text{I}$ -fibrinógeno humano. 4 ml de una solución de  $^{125}\text{I}$ -fibrinógeno humano al 0,4% se mezclaron con 200 UI de trombina humana y se dejaron reposar durante aproximadamente 60 minutos a la temperatura ambiente formando fibrina. Después de una separación suficiente de agua con papel de filtro, la fibrina se lavó completamente con solución salina fisiológica en un papel de filtro. El papel de filtro que lleva la fibrina se cortó en pequeños trozos, se mezcló con 4 ml de solución salina fisiológica y se trituró suficientemente para preparar una dispersión de  $^{125}\text{I}$ -fibrina humana, con un diámetro de partícula de 5 a 10  $\mu$ . El contenido de fibrina de la dispersión era 12 mg/ml en base húmeda y la radioactividad de  $^{125}\text{I}$  era  $293 \times 10^6$  c.p.m. A ratas de raza Wistar (machos, que pesaban cada uno 20 250 g) se administraron a cada una por la vena caudal 1 ml

de la dispersión seguido por 30.000 UI de uroquinasa que tenía un peso molecular de 54.000 o 33.000. A continuación en intervalos regulares de tiempo, se recogieron cada una a 0,3 a 0,5 ml de sangre de la arteria carótida en un tubo de ensayo que contenía una gota de solución de aprotinina (15.000 KIE/ml), una antiplasmina, y se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente. Una porción de 0,05 ml de suero separada de la sangre se ensayó para los productos de descomposición de la fibrina (PDF) midiendo la radiactividad. El porcentaje de formación de <sup>125</sup>I-PDF en sangre se determinó con el intervalo de tiempo desde el valor de radioactividad por ml del suero y la cantidad total de suero circulante (31,1 ml/kg), tomando la radioactividad de fibrina administrada como el 100%. Los resultados obtenidos fueron los que se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de formación de <sup>125</sup>I-PDF en sangre basado en la dosis administrada (uroquinasa de 30.000 UI por rata; inyección intravenosa)

Tiempo transcurrido después de la administración, minutos	Uroquinasa de peso molecular elevado (peso molecular 54.000)	Uroquinasa de peso molecular bajo (peso molecular 33.000)	Solución salina fisiológica
0	2,5	2,4	2,4
15	27,5	15,6	5,3
30	38,3	23,2	6,8
45	18,2	16,1	9,7
60	20,7	13,2	15,2
75	16,5	16,9	1,0

Se observa de la Tabla 4 que una uroquinasa de elevado peso molecular produce PDF antes que una uroquinasa de bajo peso molecular y tanto la velocidad de descomposición de la fibrina como la cantidad de PDF producida son mayores en el caso de la uroquinasa primera.

De los resultados anteriores se encontró que una uroquinasa de elevado peso molecular presenta in vivo una actividad fibrinolítica mayor y una actividad trombolítica mayor.

#### Ejemplo experimental 6.

Influencia del peso molecular en la atenuación de la uroquinasa administrada en sangre.

Las preparaciones de uroquinasa de pesos moleculares diferentes se marcaron con  $^{125}\text{I}$  por el método de Greenwood y otros [Biochem. J. 89, 114 (1963)]. La uroquinasa marcada se administró por inyección intravenosa a los grupos de animales de ensayo y se comparó la atenuación de uroquinasa en la sangre.

Las uroquinasas con un peso molecular de 54.000 (uroquinasa de peso molecular elevado; actividad específica, 100.000 UI/mg de proteína) y 33.000 (uroquinasa de bajo peso molecular; actividad específica 160.000 UI/mg de proteínas) se marcaron con  $^{125}\text{I}$  por el método de cloramina T. [Biochem. J. 89, 114 (1963)]. Las radioactividades específicas eran  $1,28 \times 10^7$  c.p.m./mg de proteínas en el primer caso y  $2,24 \times 10^7$  c.p.m./mg de proteínas en el segundo caso. El animal de ensayo empleado fueron 3 sujetos (machos, pesando cada uno de 12 a 15 kg) por grupo.

La dosis de administración fue 1.000 UI/kg en

1        ambos casos de uroquinazas de peso molecular elevado y bajo, y, ambos se administraron a través de la vena parótida. A intervalos regulares de tiempo después de la administración, se recogieron fracción de 5 ml cada una de sangre de  
5        la vena de la pata delantera empleando una jeringa que contenía 0,5 ml de una solución de citrato de sodio al 3,8%. El plasma se separó de la sangre por centrifugación y se ensayó por radioactividad con un contador de centelleo (Packard Co.). Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la Figura 2. La curva de extinción H de la uroquinazas de peso molecular elevado en sangre descendiendo más lentamente que la curva L de la uroquinazas de peso molecular bajo, siendo la vida media de la primera uroquinazas doble que la de la segunda.

15

#### Ejemplo experimental 7

Peso molecular y estabilidad de la actividad enzimática:

20        Empleando uroquinazas comercial, se examinó la relación entre el peso molecular y la estabilidad de la actividad enzimática. La uroquinazas comercial se fraccionó en fracciones de peso molecular 20.000, 30.000, 54.000 y 100.000 por filtración en gel (Sephadex G-75; una solución tampón de fosfato 70 mM de pH 8,0; columna de 2,6 x 80  
25        cm). Cada fracción se ajustó a 10.000 UI/ml (solución acuosa), se conservó a una temperatura entre 4°C y -10°C, y se examinó el cambio en la actividad con el tiempo. En la Tabla 5 se muestra el tiempo requerido hasta que se alcanzó la actividad residual del 50%.

30

Del experimento anterior se encontró que la

09038

**POOR  
QUALITY**

estabilidad de la uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000 era alrededor de 3 veces mayor que la de la uroquinasa de bajo peso molecular.

5 Tabla 5. Tiempo transcurrido hasta que se alcanza una actividad residual del 50%.

Peso molecular Temperatura de almacenamiento	20.000	33.000	54.000	100.000
	4°C -10°C	< 1 día 2,5 días	5 días 6 días	15 días >10 días

15

Ejemplo experimental 8

Ensayo de toxicidad:

20

Para el ensayo de toxicidad, se emplearon 5 ratones y 5 cobayas (pesando cada uno aproximadamente 20 g bien nutridos y sanos). Uroquinasa de peso molecular elevado que tenía un peso molecular de 54.000 (15.000 UI) se disolvió en 25 ml de agua para inyección. Cada ratón y cada cobaya fueron administrados subcutáneamente con respectivamente, 0,5 ml y 5 ml de la solución de uroquinasa anterior. 7 días después de la administración, no se observó ningún caso mortal. En este caso, la cantidad de uroquinasa que ha de administrarse fue de 300 UI por cada ratón y 3.000 UI por cada cobaya, respectivamente.

30

Empleando clínicamente la preparación de este

invento, 50 a 30.000 UI de la preparación de uroquinasa de este invento se disuelven en 0,5 a 5 ml de agua para inyección (Pharmacopea Japonesa) y se administra, teniendo en cuenta la edad, síntoma y progreso de la enfermedad, por inyección intravenosa, goteo intravenoso, infusión gota a gota, inyección subcutánea, o inyección retrovulvar.

La preparación trombolítica de este invento que contiene como ingrediente principal uroquinasa de un peso molecular de  $54.000 \pm 10.000$  es una preparación que tiene un peso molecular uniforme, excelente conservación y una alta actividad trombolítica, que permite la asociación y dosificación para ser normalizada. Además, la preparación trombolítica de este invento presenta un efecto trombolítico suficiente a un nivel de dosis de baja potencia. Por consiguiente, el presente invento proporciona una preparación farmacéutica útil en el campo terapéutico.

El invento se ilustra además a continuación con referencia a los ejemplos.

#### Ejemplo 1

Orina reciente recogida de adultos macho se ajustó a pH 7,2. Cinco litros de la orina ajustada se alimentó a la parte superior de una columna rellena con 50 ml de L-arginina-agarosa (equilibrada con una solución de cloruro de sodio al 2% de pH 7,2) para adsorber la uroquinasa en la columna. La columna se lavó con 100 ml de una solución de cloruro de sodio al 2% de pH 7,5 y la uroquinasa se eluyó con una corriente descendente de 50 ml de una solución de cloruro de sodio 1 M de pH 6,0. El eluato se concentró hasta alrededor de 10 ml y se alimentó a una co-

lumna, 2,6 x 80 cm, rellena con Sephadex G-75 (Pharmacia Co.); equilibrada con una solución de tampón de fosfato de 70 mM de pH 8,0) y se sometió a una filtración con gel a un caudal de 20 ml/hora, empleando la misma solución tampón que se usa en el equilibrio. El filtrado se recogió en porciones de 0,5 ml y se recuperaron las fracciones que contenían uroquinasa que tenía un peso molecular de  $54.000 \pm 10.000$ . La solución acuosa recuperada que contenía uroquinasa se analizó por el método simplificado de la determinación del peso molecular por electroforesis SDS en gel de poliacrilamida [Colowick-Kaplan, Method in Enzymology, 26, 3 (1972)]. Se confirmó el peso molecular por un pico único correspondiente al de la muestra de uroquinasa normalizada de un peso molecular de aproximadamente 54.000. La solución acuosa se dializó frente a solución salina fisiológica y se liofilizó obteniendo una muestra de uroquinasa que tenía una actividad específica de 17.000 UI/mg.

#### Ejemplo 2

La uroquinasa (actividad específica 17.000 UI/mg) obtenida en el Ejemplo 1 se disolvió en una solución tampón de fosfato 0,05 M a pH 7,0 obteniendo 20 litros de una solución acuosa de uroquinasa  $3.000$  UI/ml; contenido de proteínas 0,02% (P/V). La solución se calentó a 60°C durante 10 horas, a continuación se enfrió bruscamente en agua con hielo y se filtró a través de un filtro bacteriano. El filtrado se dividió en porciones de 2 ml y se liofilizó obteniéndose una preparación de uroquinasa con virus inactivados.

30

19019

Ejemplo 3

A 5 litros de una solución acuosa de uroquina  
sa [10.000 UI/ml; contenido de proteínas 2,5% (P/V)] prepa  
rado disolviendo uroquinasa bruta (actividad específica  
5 400 UI/mg) en una solución tampón de fosfato 0,1 M de pH  
6,0; se añadió 0,3 M de cloruro de sodio disuelto en la  
misma solución tampón que se ha usado antes. La solución  
resultante se agitó suficientemente y a continuación se ca  
lentó a 60°C durante 10 horas. La solución así tratada se  
10 dializó frente a una solución de cloruro de sodio 0,0075 M  
de pH 7,0 a través de un tubo de diálisis hecho por  
Visking Co. La solución acuosa dializada de uroquinasa  
bruta se alimentó a una columna rellena con 1 kg de bento  
nita en polvo que se equilibró con una solución acuosa de  
15 cloruro de sodio 0,0075 M de pH 7,0. La uroquinasa se ad  
sorbó sobre la bentonita mientras que las impurezas pasa  
ban a través de la columna sin adsorberse. Las impurezas  
adheridas a la bentonita se eliminaron por lavado por una  
solución de cloruro de sodio 0,1 M de pH 9,0. La uroqui  
20 nasa se eluyó con una solución acuosa al 2,0% (P/V) de lac  
tato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina hidratado.

La solución de uroquinasa resultante contenía  
alrededor de 70% de la uroquinasa inicialmente presente en  
el material de partida y tenía una pureza de 11.000 UI/mg.  
25 Después de haber sido dializada con una solución salina fi  
siológica, la solución de uroquinasa se filtró a través  
de un filtro bacteriano, se dividió en porciones de 2 ml  
y se liofilizó obteniéndose una preparación de uroquinasa  
con virus inactivados.

30

La solución acuosa de uroquinasa recuperada

antes se analizó por el método simplificado de la determinación del peso molecular por electroforesis SDS en gel de poliacrilamida [Colowick-Kaplan, Method in Enzymology, 26, 3 (1972)]. Se confirmó el peso molecular por un pico o

5 máximo único correspondiente al de la muestra de uroquinasa patrón de un peso molecular de aproximadamente 54.000.

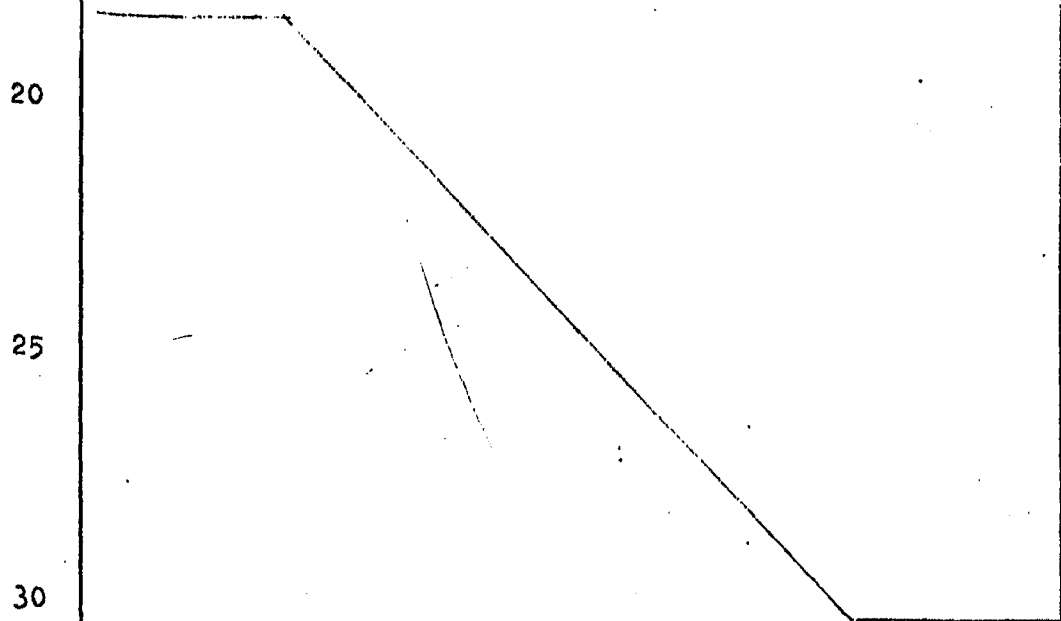
Significado de las magnitudes de las gráficas de los dibujos.

Fig. 1

10 Eje de ordenadas: Relación de actividad residual (%)  
Eje de abscisas: pH de la solución acuosa de uroquinasa.

Fig. 2

15 Eje de ordenadas: Curva de extinción inmediatamente después de la inyección.  
Eje de abscisas: Tiempo después de la inyección intravenosa (minutos)



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 método mejorado de recuperar uroquinasa de una orina reciente o una solución de uroquinasa bruta, que comprende las operaciones de: 1) adsorber uroquinasa sobre un adsorbente seleccionado; 2) eluir y recuperar la uroquinasa adsorbida; 3) tratar con calor la solución de uroquinasa recuperada, a una temperatura de 50° a 70°C durante 8 a 12 horas; y 4) someter a diálisis la solución tratada con calor, llevándose a cabo cada una de las operaciones mencionadas a un pH de 5,5 a 12, con el fin de recuperar uroquinasa que tiene un peso molecular de 54.000  $\pm$  10.000.

15

20

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que se añade un estabilizador frente al calor para la uroquinasa a la solución acuosa que contiene uroquinasa.

25

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2ª, en el que el estabilizador frente al calor se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, sacáridos, sales neutras y proteínas.

30

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2ª, en el que el estabilizador frente al calor es glicina, lisina, arginina, sacarosa, manita, cloruro de sodio o gelatina.

5a.- UN METODO MEJORADO DE RECUPERAR UROQUINASA  
DE UNA ORINA RECIENTE O UNA SOLUCION DE UROQUINASA BRUTA.

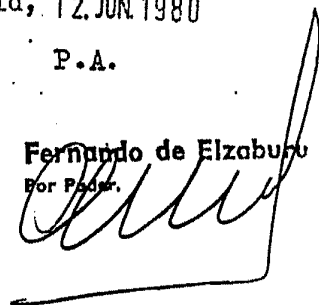
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 12 JUN 1980

P.A.

Fernando de Elzaburu  
Por Poder.



10

15

20

25

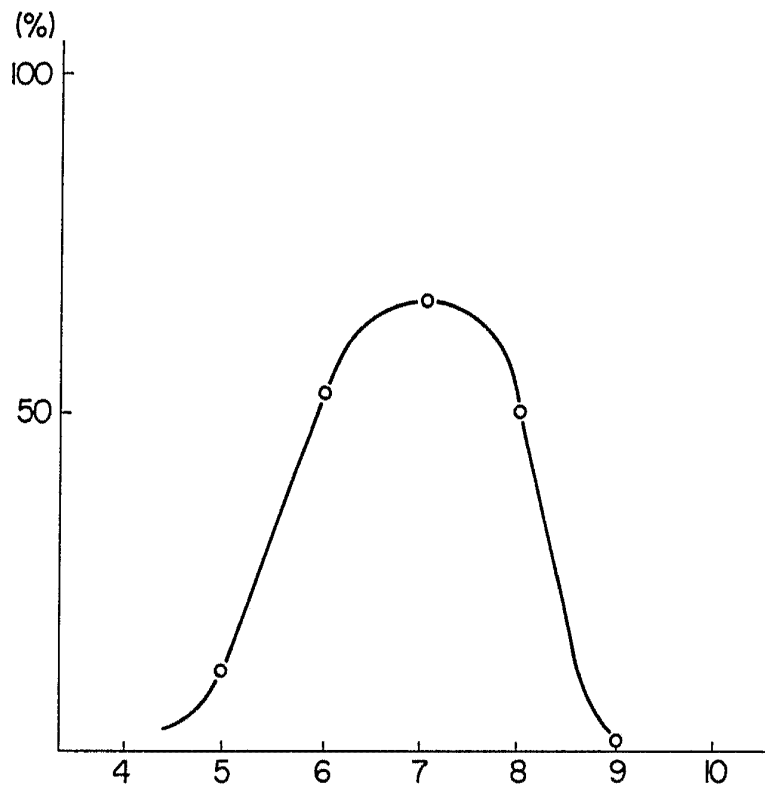
30

090680

VAL

P70797

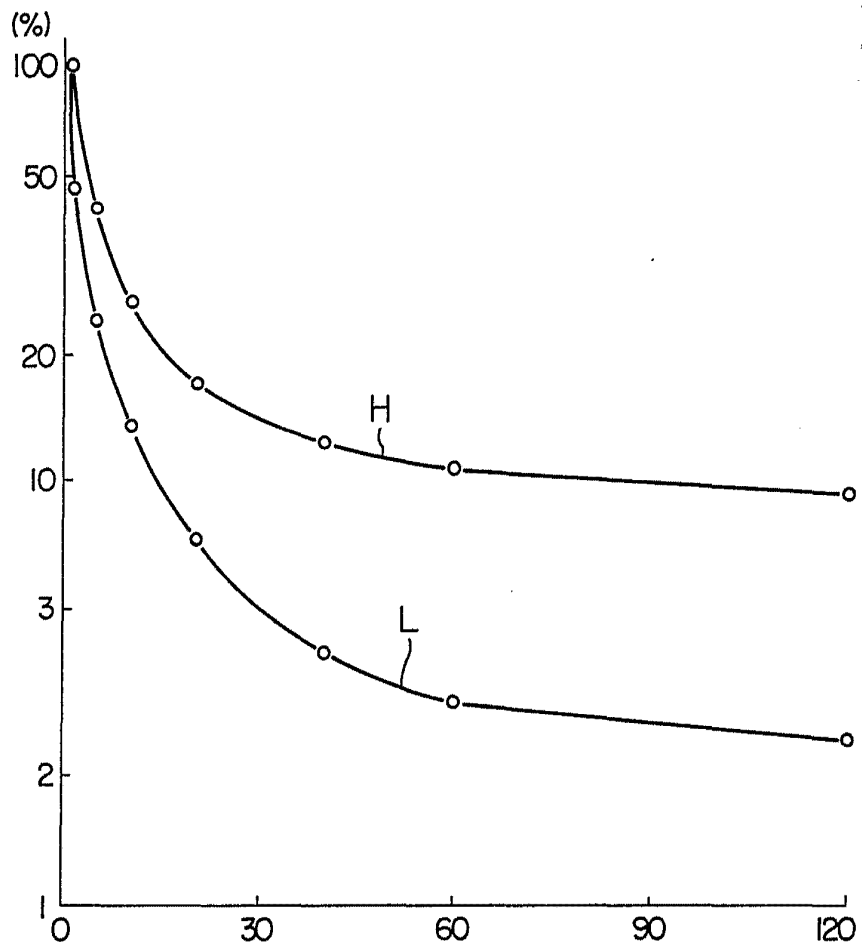
FIG. 1



Fernando de Elzaburu  
Perú

P70797

FIG. 2



*[Handwritten Signature]*  
Fernando de Siqueira  
por Poder