

221431

P - 13.217

17 JUN 1955

221431



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de DR. KARL-HEINZ JÄNGER y DR. HEINRICH MITTENZWEI,
de nacionalidad alemana, residentes el 1º en Sonnenstr. 3,
Friburgo y el 2º en Schmidstr. 10, Munich, ambos en Alema-
nia, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE MATERIAS
REGULADORAS DEL CRECIMIENTO".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

El presente invento se refiere a un pro-
cedimiento para la obtención de materias reguladoras
del crecimiento a partir de órganos de seres vivientes



IN 1944

221431

de organización superior.

Es conocido un procedimiento para la obtención de extractos de tejidos, que pueden ser empleados terapéuticamente en degeneraciones, mala regeneración, tumores malignos, etc. La producción de estos extractos se realiza, infiriendo heridas a animales, preferentemente no capaces todavía de procrear, o bien a personas, y una vez terminada la cicatrización, extirpando el tejido de granulación formado en las heridas, y extrayéndolo de la manera conocida. De acuerdo con el procedimiento conocido, se puede también, dado el caso, seguir cultivando el tejido de granulación y otros tejidos orgánicos en plasma nutritivo, lesionar los cultivos de tejidos así obtenidos y extraer a continuación. Finalmente, se puede también de acuerdo con el procedimiento conocido, fabricar un suero a partir de los extractos obtenidos, para lo cual se inyectan en animales, se extrae sangre de los animales tratados después de un cierto tiempo de incubación, y se fabrica con ella un suero de la manera conocida. El procedimiento conocido es caro, y el rendimiento de sustancia activa, tan sólo escaso.

De acuerdo con el invento, para la obtención de materias reguladoras del crecimiento se ponen el mesenquima y/o el parénquima de los órganos de seres vivos de organización superior en un estado de actividad modificada, mediante radiación y/o incorporación de excitantes químicos, después de lo cual las materias re-



221431

5 reguladoras del crecimiento formadas en los órganos, o bien se obtienen mediante extirpación de los órganos e inmediata extracción de acuerdo con los procedimientos corrientes, o bien se aíslan de los humores corporales de la manera usual.

10 En las materias reguladoras del crecimiento, que se obtienen por el procedimiento de acuerdo con el invento, se trata, entre otras, de hormonas, que fomentan el crecimiento normal hasta el desarrollo total, o que provocan la sustitución normal de células, la transformación del protoplasma y la regeneración de células normales en el organismo desarrollado; de sustancias formadas en los diversos sistemas orgánicos, que ejercen una función igual e similar, así como de materias inhibidoras del crecimiento, que actúan antagónicamente a las hormonas y sustancias
15 antes citadas.

20 Bajo seres vivientes de organización superior en el sentido del presente invento, deben entenderse preferentemente los vertebrados, y de éstos, preferiblemente los de sangre caliente.

25 Como ejemplos de órganos de estos seres vivientes de organización superior, que son sometidos al tratamiento de acuerdo con el invento, han de considerarse la piel, la musculatura, el esqueleto, el hígado, el riñón, el bazo, la próstata y otras glándulas endocrinas en el sentido más estricto.



221431

Es conocido, que mediante radiación sobre el mesénquima o el parénquima de los más diversos órganos, se puede ejercer una acción excitante sobre dichos órganos, poniéndolos en un estado de actividad modificada. Presumiblemente es el proceso de regeneración siguiente, el que es responsable de la formación de las materias reguladoras del crecimiento del tipo más arriba indicado. Para la realización del procedimiento de acuerdo con el invento, por lo tanto, resulta apropiada cualquier energía de radiación, desde la radiación radioactiva de onda mínima, pasando por las radiaciones de rayos x de onda corta, media y larga, hasta los rayos límites (radiación Bucki). También la radiación ultravioleta, la luz visible, la radiación infra-roja y la radiación térmica de onda larga, resultan apropiadas para la realización del procedimiento según el invento. Son además aplicables para el procedimiento de acuerdo con el invento, los rayos corpusculares, tales como los rayos canal, electrones rápidos, neutrones, positrones y partículas elementales similares, incluso las procedentes de isótopos radioactivos. Igualmente pueden emplearse ondas de ultrasonido.

La extraordinaria ventaja de la aplicación de radiaciones para poner el mesénquima o el parénquima de órganos en un estado de actividad modificada, consiste en que la mayoría de las clases de radiación pueden ser enfocadas, concentrándose así sobre un determinado plano



JUN. 1955

221431

del cuerpo. Como la radiación es a su vez dosificable, se pueden poner los órganos correspondientes en cualquier estado deseado y controlable de actividad modificada.

5 En combinación con la radiación o también por separado, se puede provocar también el estado de actividad modificada mediante la incorporación de activantes químicos. Esta incorporación puede realizarse por vía de inyección, de toma, o alternativamente de administración, de fricción o de inhalación. Se pueden introducir las materias excitantes correspondientes en determinadas cavidades del cuerpo, aportarlas con ayuda de recursos mecánicos o hacerlas actuar por vía percutánea.

10 Los excitantes químicos, que son apropiados para la realización del procedimiento de acuerdo con el invento, son por ejemplo los colorantes, y especialmente los que poseen una zona de fluorescencia específica. Son especialmente apropiados los colorantes, cuyo espectro de absorción se encuentran en la zona de la radiación aplicada. También sustancias en sí indiferentes, tales como el negro humo, el carbón, el caolín, el ácido silícico y similares, pueden hallar aplicación. Son a su vez apropiadas las materias, que encuentran aplicación como medicamentos, preferentemente los que pueden ser almacenados en determinados sistemas orgánicos, tales como sulfonamidas, antibióticos, medios de contraste para rayos X, compuestos inorgánicos y orgánicos que



221431

contengan metales pesados, sustancias químicas agresivas, como por ejemplo mostazas nitrogenadas, hipnóticos, derivados del ácido nucleínico, especialmente los fosforilizados, anestésicos y sus productos de desdoblamiento, vacunas, sueros, pirógenos, productos de desdoblamiento de las proteínas, productos del metabolismo (también intermedios), desinfectantes y similares. Aparte de las materias que acabamos de citar, el perito en la materia conoce todavía innumerables otras sustancias excitantes de origen animal o vegetal, que pueden igualmente ser tenidas en cuenta para el procedimiento de acuerdo con el invento.

Como excitantes químicos, o más bien como activadores para excitantes químicos, pueden considerarse también elementos o compuestos radioactivos, tales como por ejemplo cobalto, yodo o fósforo radioactivos.

Resulta ventajoso emplear excitantes químicos, que posean una afinidad específica para el órgano, o que sean acumuladas en el mesénquima.

Según ha sido ya mencionado, la radiación y/o la incorporación de excitantes químicos de acuerdo con el invento, ejerce sobre el mesénquima y/o el parénquima, un efecto excitante, poniéndolas en un estado de actividad modificada. Bajo un estado de actividad modificada debe entenderse un estado, que sobrepase positiva o negativamente el metabolismo de reposo del órgano



221431

o del sistema de órganos. Especialmente entran en este concepto también los cambios del estado de actividad dentro de celdas sueltas, que en sí pertenecen a un parénquima o mesénquima de órgano.

5 En otro perfeccionamiento del procedimiento de acuerdo con el invento, el mesénquima o el parénquima, que mediante radiación o incorporación de excitantes químicos han sido puestos en un estado de actividad modificada, pueden seguir siendo cultivados en medios
10 nutricios de la manera usual, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento de Carrell, consiguiéndose así un crecimiento del tejido y con ello, un aumento de las sustancias reguladoras del crecimiento en la extracción siguiente. El rendimiento de sustancias reguladoras del crecimiento puede dado el caso, ser aumentado todavía más, so-
15 metiendo los tejidos o alternativamente la papilla de tejidos, antes de la extractación, a un procedimiento fermentativo de enriquecimiento.

 Las extractaciones previstas en el procedimiento de acuerdo con el invento, se realizan de la
20 manera usual, es decir, por ejemplo empleando disolventes de acción selectiva, adsorción en adsorbentes de acción específica, tales como gel de sílice, hidróxido de aluminio, floridina, materias albuminosas, celulosa, y
25 similares, y elución subsiguiente.

 Resulta conveniente someter los extractos obtenidos a una purificación, lo cual puede efectuarse



221431

se por los métodos conocidos desarrollados para la purificación de enzimas y hormonas, tales como precipitación con sales de metales pesados de acción específica, bases orgánicas, disolventes inorgánicos u orgánicos y similares. Como otros métodos de purificación, mencionaremos la dialisis, la cromatografía, y la separación en contra-corriente.

En la extracción, y mediante el empleo de un disolvente adecuado, se efectúa convenientemente una separación en una fracción lipídica y una fracción acuosa, que se someten por separado a los procedimientos de purificación corrientes. Los productos de dichos procedimientos pueden entonces ser aplicados, bien sea por separado, o bien conjuntamente. También pueden ser empleadas a la vez, en la extractación, materias de actividad superficial. Durante o después de las fases de extractación y de purificación, se pueden intercalar procesos de activación, como son corrientes, o sea, por ejemplo una hidrólisis ácida o alcalina, un desdoblamiento fermentativo total o parcial, una radiación o similares. Las medidas de reactivación son siempre recomendables, cuando se dispone de las sustancias reguladores del crecimiento en forma parcial o totalmente inactivada, o cuando han sido segregadas, tal como por ejemplo es el caso en la segregación de la orina.

En lugar de preparar los órganos tratados de acuerdo con el invento por extractación, se puede tam-



221431

5
10
15
20
25

bién proceder extrayendo de los correspondientes órganos mediante la introducción de cánulas o sondas, mediante punción, mediante lavado o similares, los humores corporales en ellos contenidos, de los cuales se separan después por los medios usuales de extracción, las sustancias reguladoras del crecimiento. En casos apropiados, se puede preparar de los humores corporales obtenidos, tales como por ejemplo sangre o líquido céfalo-raquídeo, después del correspondiente tratamiento previo, por ejemplo eliminación de la albúmina, directamente un suero.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento según el invento, las sustancias reguladoras del crecimiento obtenidas por uno de los métodos anteriormente descritos, pueden ser inyectadas a animales de experimentación, para, después de un tiempo de incubación, cuya duración se determina de manera empírica mediante ensayos previos, obtener un suero de la manera usual.

Bajo humores corporales en el sentido del presente invento, citaremos, entre otros, la sangre o alternativamente los componentes de la sangre, la orina, el líquido céfalo-raquídeo, exudados y trasudados, líquido ventricular, el líquido amniótico, el líquido lacrimal, la saliva, el líquido pancreático, la secreción intestinal, así como las segregaciones de mucosas secesionadoras, y el suero.

De acuerdo con el invento, se puede también



221431

poner el mesénquima y/o el parénquima de los órganos de seres vivientes de organización superior, en un estado de actividad modificada, estrangulando la recepción de oxígeno del órgano a utilizar, bien sea por vía mecánica, o bien mediante la acción del frío (efecto dosificado de congelación).

Con las sustancias reguladoras del crecimiento obtenidas por el procedimiento de acuerdo con el invento, se pueden conseguir éxitos terapéuticos considerables en enfermedades degenerativas y malignas.

Los ejemplos siguientes servirán para ilustrar el invento con más detalle:

Ejemplo 1:

Un riñón de una vaca virgen sana, se irradia con una radiación profunda de rayos X en dosis dispersas, con al menos 3000 r y empleando una chapa de aluminio de 1 mm, a una tensión de por lo menos 120 kv. Desde el momento en que mediante análisis de la orina extraída por sondaje del riñón irradiado, se comprueba que vuelve a reanudarse la actividad del riñón irradiado, se pone éste al descubierto operativamente, se conecta a la vena del riñón una cánula de punción, y se extrae de la vena alrededor de 40% de la cantidad de sangre circulante, que se somete a extracción de acuerdo con el procedimiento siguiente:

La sangre del animal de experimentación, recién terminada de extraer, se plasmoliza y se libera de



2 21431

albúmina con ácido tricloroacético. Una vez libre de albúmina el líquido, se somete primeramente, con un pH 2 - 9, a una fermentación péptica-tríptica, con objeto de liberar las sustancias activas en él contenidas, y después de terminada la digestión, que preferentemente se lleva a cabo a 37°, se vuelve a purificar de albúmina. El líquido así obtenido se concentra hasta 1/2 a 1/4 del volumen primitivo, se mezcla con cinco veces la cantidad de acetona libre de agua, y se extrae por centrifugado el sedimento producido. El sedimento es sometido a extracción con éter o cloroformo, preparándose el extracto lipoidal por separado. El residuo del precipitado en la acetona, se extrae varias veces con una solución salina isotónica, preferentemente a pH 5 - 7, y el extracto se libera de la albúmina acompañante mediante precipitación fraccionada en alcohol. La solución residual se liofiliza, y el producto seco se emplea, o bien directamente para la obtención de una solución inyectable isotónica, o bien, una vez transformado en una solución acuosa, se dializa y se emplean por separado el dializado exterior, así como el dializado interior. El extracto cloroformico o etérico, que contiene lipoides, se purifica, por los procedimientos usuales, de ácidos grasos, colesteroína y otras sustancias acompañantes, y el residuo activo se recibe en aceite de oliva. Este producto está destinado a inyecciones intramusculares.



221431

Ejemplo 2:

Un carnero en edad de ser sacrificado, es sometido en sus huesos innominados a un tratamiento intenso de ultra-sonido, sacrificándose preferentemente 8 días después de terminado el tratamiento. A continuación se someten los huesos innominados a una extracción.

Ejemplo 3:

La orina de un enfermo de hipertireoidismo, tratado por motivos terapéuticos en días consecutivos con yodo radioactivo, se recoge desde el comienzo de la inyección del yodo radioactivo, hasta alcanzar el tiempo de valor medio - dado el caso, hasta pasado éste - del isótopo del yodo empleado, y se prepara. La preparación de la orina se realiza después de concentrar en el vacío, de igual manera que la indicada en el Ejemplo 1 para la preparación de la sangre. Dado el caso, se puede someter el concentrado, también antes de seguir siendo tratado, a una diálisis.

Ejemplo 4:

Un cerdo corredor sano, recibe en días consecutivos de 5 a 7 inyecciones diarias de un colorante azo acuoso soluble (un derivado de la diamino-azobenzol-p-sulfonamida). Después de presentarse una fuerte coloración amarilla de la piel, se somete el cerdo a una radiación de luz de cuarzo con dosis eritémica doble hasta triple. Durante o inmediatamente después de regresar el eritema, se recoge la orina del animal, y se prepara de



21431

acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. se obtienen igualmente productos muy activos, sometiendo la piel del animal sacrificado, poco antes de regresar el eritema, a una extracción. Esta extracción se realiza preferentemente de forma, que la piel homogenizada se deshidrata con acetona, y se extrae el residuo obtenido todavía varias veces con una mezcla de acetona y éter. La componente obtenida en el extracto de acetona y éter, preponderantemente soluble en lipídeos, se fracciona en una columna neutra de óxido de aluminio, después de transformada en una solución benzólica. Por éstos u otros procedimientos de adsorción similares, se puede liberar la fracción activa, de sustancias acompañantes, tales como ácidos grasos, colesteroína y otras. La piel homogenizada, extraída con acetona y éter, se extrae con diez veces la cantidad de solución salina fisiológica en una cámara refrigeradora a $+ 4^{\circ}$, agregando toluol, y agitando durante 24 horas. Los componentes sólidos se separan por centrifugado, y la fase líquida se libera de iones de sodio en un permutador de cationes. Mediante precipitación fraccionada en alcohol a diversas gamas de pH, preferentemente pH 5 y 8, se purifica de albúmina la solución activa obtenida, y dado el caso, se liofiliza a continuación.

25 Ejemplo 5:

A una vaca virgen sana, se inyectan 14 días antes de ser sacrificada, varias inyecciones de



221431

tinta china de 1 - 10% de la cantidad de sangre circulante. Un día después de la última inyección, y después de sacrificado el animal, se extraen los órganos que tienen visible acumulación de tinta china en el endotelio reticular, que son preparados de acuerdo con uno de los métodos más arriba descritos.

Ejemplo 6:

A una ternera se inyecta una cantidad suficiente de un medio de contraste para rayos X, que contenga yodo, a efectos de una representación radiológica del bazo. Inmediatamente después de hacerse visible el bazo en la pantalla de rayos X, se narcotiza el animal, se pone al descubierto el bazo, se llenan con agujas de radio, se separan éstas preferentemente al cabo de 30 minutos, y una vez cosida la herida, se da comienzo a la recogida de la orina hasta la eliminación completa del yodo. La orina se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. A continuación se sacrifica el animal, se extrae el bazo, se muele, y la papilla de tejidos se trata por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, o se emplea para la inmunización de un caballo. El suero de caballo activo, contiene las sustancias reguladoras del crecimiento en una concentración elevada.

Ejemplo 3:

Se narcotiza una rata blanca hembra de al menos 150 g de peso. Las dos patas traseras se intro-



221431

ducen en una mezcla frigorífica, donde se mantienen hasta
en completa congelación. Después de volverse a deshelar
las patas, se mantiene el animal hasta 24 horas a una
baja temperatura ambiente, preferentemente de 15°, a con-
5 tinuación de lo cual se sacrifica, y se preparan las pa-
tas traseras por uno de los procedimientos más arriba
descritos.

Ejemplo 8:

Un perro de aproximadamente 15 kg. de peso,
10 es narcotizado, provocándose la estrangulación de la co-
rriente sanguínea durante 10 - 30 minutos, mediante la
aplicación de una ligadura sobre las extremidades delan-
teras o traseras. Después de retirada la ligadura de re-
presión, se introduce con toda rapidez una cánula en la
15 vena principal de la extremidad, recogiénose la sangre
que sale de la vena, hasta que la tensión del oxígeno de
la sangre manante alcanza valores normales. La sangre así
obtenida, es preparada de acuerdo con el Ejemplo 1.

Ejemplo 9:

20 Aun huevo de gallina empollado, se le
extraen partes del corazón después de dar comienzo las
contracciones cardíacas, se introducen aquéllas en reci-
pientes de cultivo de tejidos preparados previamente de
la manera usual, y se las somete en éstos a una prolife-
25 ración. Una vez que se observan contracciones en el teji-
do cardíaco del polluelo, se irradia dicho tejido con



221431

una fuerte fuente luminosa, hasta hacerse ostensible una debilitación marcada de las contracciones. La cámara de cultivo se riega entonces, después de aplicarse un dispositivo para un riego lento continuo mediante una solución de Tyrode u otra de las soluciones nutricias usuales, y el líquido de riego que sale, que puede estar enriquecida con sustancias favorecedoras del crecimiento, se prepara tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, después de concentrado. El cultivo del tejido puede también modificarse en el sentido de que no solamente se cultive un tejido, sino dos o varios a la vez. El tejido puede ser extraído de un órgano, que haya sido sometido al procedimiento de modificación de su actividad. Otra variante del procedimiento consiste en que se efectúa una radiación continua con baja intensidad, llevándose a cabo el riego de la cámara de cultivo durante la radiación continua.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Alemania el 27 de Abril de 1954, bajo el No. J 8578 IVa/30h, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

Los puntos de invención propia y nueva que



2 21431

se presentan para que sean objeto de esta Patente de In-
vención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1º. - Un procedimiento para la obtención
de materias reguladoras del crecimiento, caracterizado
porque el mesenquima y/o el parénquima de órganos de
seres vivientes de organización superior, son puestos
en un estado de actividad modificada, mediante radiación
y/o incorporación de excitantes químicos, después de lo
10 cual se obtienen las materias reguladoras del crecimen-
to formadas en los órganos, bien sea por extirpación de
los órganos e inmediata extracción por los procedimientos
corrientes, o bien aislándolas de los humores del cuerpo
de la manera usual.

15 2º. - Un procedimiento de acuerdo con la
reivindicación 1, caracterizado porque el mesenquima y/o
el parénquima, puestos en un estado de actividad modifi-
cada, se reproducen mediante cultivo en medios nutricios
usuales, antes de ser sometidos a la extracción.

20 3º. - Un procedimiento de acuerdo con la
reivindicación 1, caracterizado porque las materias re-
guladoras del crecimiento generadas, se obtienen direc-
tamente de los órganos, mediante extracción de humor del
cuerpo.

25 4º. - Un procedimiento de acuerdo con la
reivindicación 3, caracterizado porque el humor extraído
del cuerpo se transforma en suero.

5º. - Un procedimiento de acuerdo con las



221431

reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque los extractos que contienen las materias reguladoras del crecimiento, o bien los humores del cuerpo enriquecidos con tales materias reguladoras del crecimiento, se inyectan a animales, y después de un tiempo de incubación adecuado, se obtienen los sueros de la manera usual.

6ª. - Un procedimiento para la obtención de materias reguladoras del crecimiento.

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

Esta Memoria consta de dieciocho hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 17 JUN. 1955

P. A.

Alberto de Elzaburu

Por Orden.