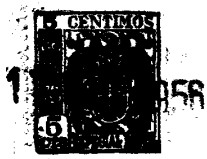


229215

17 MAR 1956

P - 14.763.-

O No.7528 "Case 20
Leucocytosefaktor



229215

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
PATENTE DE INVENCION
en
ESPAÑA
por VEINTE años

a nombre de NYEGAARD & CO. A/S., entidad noruega, establecida en Sandakerveien 103, Oslo, Noruega, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UNA SUSTANCIA QUE PRODUCE LEUCOCITOSIS (EL FACTOR DE LA LEUCOCITOSIS) A PARTIR DE EXTRACTOS DE HIGADO ACUOSOS".-

-0-

La presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de una sustancia que ocasiona leucocitosis en los seres humanos y en los animales. Como material de partida para el proceso se usa extracto de hígado obtenido del hígado de animales, especialmente ganado vacuno de un modo conocido.

Por el presente método los inventores han logrado producir sustancias que contienen el factor de la leucocitosis en una concentración extremadamente alta y en un estado particularmente puro, libre de impurezas



de naturaleza perjudicial. La sustancia obtenida conforme con este método ha demostrado ser activa en los seres humanos en la dosis de 1 mg. diario o menos, mientras que hasta ahora, al menos según los informes del solicitante, no se habían producido sustancias de esta naturaleza que tuviesen efecto en dosis menores de 30 mg. por día.

El efecto estimulante, por administración oral de hígado integral, sobre la leucocitosis se conoce de antiguo y se sabe también que se puede obtener un efecto semejante por administración parenteral de extractos de hígado. Se ha establecido asimismo que el extracto de hígado posee un efecto definido sobre el recuento de leucocitos, incluso en los individuos sanos. Por la introducción parenteral de extracto de hígado se ocasiona una leucocitosis que normalmente alcanza un máximo en el curso de 5-6 horas después de inyectar intramuscularmente el extracto, produciéndose un aumento de aproximadamente 100 % en el recuento de leucocitos. Se ha establecido también que la leucocitosis se debe a un aumento de los granulocitos, con una simultánea desviación a la izquierda en la distribución de los granulocitos.

Este efecto del extracto de hígado sobre el recuento de leucocitos se ha utilizado también terapéuticamente, por el uso de inyecciones de extractos hepáticos en casos de leucopenia, especialmente de agranulocitosis.



229215

Así, se sabe que el extracto de hígado ordinario contiene un principio activo que ocasiona leucocitosis en los seres humanos y en los animales.

Ordinariamente los extractos de hígado consisten en extractos acuosos de hígado fresco con o sin proteólisis previa, seguida en general por la separación de las proteínas mediante precipitación con alcohol, con o sin subsiguiente extracción con fenol saturado de agua, adición de éter al fenol y re-extracción de la fase fenol-éter con agua. Para quitar la histamina y otras aminas que tienen efectos perjudiciales, los extractos hepáticos destinados a inyección se tratan usualmente con permutita. Tales extractos hepáticos encuentran amplia aplicación en terapéutica y son particularmente valiosos en los casos de anemia perniciosa. El valor terapéutico de dichas preparaciones de hígado se supone que depende en grado sustancial de su contenido de vitamina B₁₂.

Antes de ahora se ha dicho que se ha aislado un factor de leucocitosis del extracto de hígado. Este factor se dice que se ha obtenido en forma cristalina por precipitación fraccionada con acetona de un extracto hepático acuoso. No contenía ácido fosfórico y era activo en una dosis de 30 mg. por día. Este factor debe ser en este caso diferente del factor a que se refiere esta invención, el cual es activo en dosis menores de 1 mg. y posee propiedades claramente ácidas y contiene fósforo. Además, se ha descrito anteriormente un factor de la leucocitosis soluble en las grasas, encontrado en la parte



229215

insaponificable de la grasa de ciertos órganos, médula ósea, bazo, glóbulos rojos e hígado. Este factor lipóide es también diferente del factor de la leucocitosis soluble en el agua a que se refiere esta invención.

5 En la realización de este método de acuerdo con la invención se puede usar extracto hepático obtenido de diversos modos. Por ejemplo, se puede partir de extracto hepático producido a partir de hígado de ganado vacuno y utilizar la proteólisis, la separación de materias extrañas por precipitación con alcohol, la extracción de la solución, después de separar los alcoholes, con fenol líquido saturado de agua, después de lo cual la fase fenólica se diluye con éter y la fase fenol-éter se extrae finalmente con agua, que contiene ahora el factor de la leucocitosis.

15 En el método de acuerdo con la invención, el material de partida es generalmente extractos de hígado y el proceso se efectúa como sigue:

20 Al extracto hepático acuoso se añade álcali hasta tal punto que el extracto se ajuste a un pH comprendido entre 5 y 10 del extracto se precipita un factor que contiene leucocitosis por adición de un acetato, cuyo catión es uno de los metales del grupo que forman el bario, el calcio o el plomo, y de alcohol, y el precipitado que se forma de esta manera se separa de la solución y se disuelve en agua, después de lo cual la solución acuosa se trata con una resina de cambio iónico ácida, por la cual 25 dichos metales y las impurezas son adsorbidos, en tanto

229215

que la solución contiene el factor de la leucocitosis. Debe observarse que esta sustancia, si se toma como base la actividad clínica y el contenido de sólidos, representa un enriquecimiento de 50 veces en comparación con el material de partida. La solución separada de la resina de cambio iónico se trata después con una resina de cambio iónico básica, que absorbe o combina el factor de la leucocitosis y esta última resina de cambio iónico se trata con amoníaco diluido y de la solución en amoníaco acuoso así obtenida se recupera por evaporación y secado una sustancia que contiene el factor de la leucocitosis en una forma muy enriquecida.

Debe advertirse que las diversas soluciones obtenidas por las sucesivas operaciones mencionadas se suelen someter a refinación adecuada de manera conocida, cuando esto es conveniente, antes de que las tales soluciones se continúen tratando por la fase o fases siguientes del proceso. Así, la solución tratada con la resina de cambio iónico ácida se trata adecuadamente con carbón activo para separar ciertas sustancias soporte antes de tratar la solución con la resina de cambio básica.

La citada evaporación final se efectúa adecuadamente en vacío y el secado se realiza por el método de la congelación. Se obtiene entonces una sustancia pardo-amarillenta que es clínicamente activa en una dosis de aproximadamente 1 mg. Esto representa un enriquecimiento de aproximadamente 2500 veces con respecto al material de

1701

229215

partida. De los métodos de fraccionamiento empleados se deduce que el factor de la leucocitosis actúa químicamente como una sustancia ácida.

5 Antes de la precipitación del extracto de hígado con acetato y alcohol el líquido se ajusta ventajosamente a un pH de 8 a 8,4 y, preferiblemente, de 8,2.

Además, se ha encontrado que es lo más conveniente usar acetato bórico y alcohol como agentes de precipitación.

10 El tratamiento de la resina de cambio iónico básica que ha absorbido el factor de la leucocitosis se efectúa con ventaja particular mediante amoniaco acuoso que contenga el amoniaco en una concentración de 0,1 a 2 N, preferiblemente de 0,5 N.

15 De acuerdo con una característica de la invención el precipitado obtenido mediante acetato bórico, acetato cálcico o acetato de plomo se descompone con ácido sulfúrico diluido y el sulfato difícilmente soluble que se forma de esta manera se separa de la solución, la cual
20 se trata después como se describe.

Se ha visto asimismo que la sustancia concentrada así obtenida se puede aislar y purificar todavía más sometiendo la solución acuosa de las sustancias a electroforesis después de añadir a la solución una sustancia
25 amortiguadora alcalina, con lo cual la sustancia activa emigra hacia el ánodo. Esta fracción enriquecida se concentra y la sustancia activa se obtiene del producto con-



229215

IR 120 (H), húmeda, 40-60 mallas). La columna se lavaba con agua hasta que la solución que escurría por aquella tenía un pH de 5,5-6. La solución era entonces incolora. A la solución se añadía luego NaOH 2N a pH 6,5; se concentraba en vacío y, finalmente, se secaba por congelación. El producto pesaba en estado seco 2,9 g.

Se disolvieron en 50 ml. de agua 0,5 g. del producto (equivalentes a 1 Kg. de hígado fresco). A la solución, que tenía un pH de 6,6, se añadieron 1,5 g. de carbono (Norit X, índice = 32), que anteriormente se había lavado con agua y después con alcohol. Después de dejar reposar durante 19 horas se filtraba el carbono de la solución y se lavaba con agua hasta que el filtrado era incoloro. Los filtrados recogidos se concentraban en vacío y pesaban, luego de secados por congelación; de 0,250 g.

Se disolvieron 0,175 g. de este material en 20 ml. de agua y se añadía NaOH 2 N a un pH de 8,7. La solución se pasaba después lentamente a través de una columna de resina cambiadora de iones básica (Amberlite I B4B (OH); 2,2 cm. x 6 cm., 40-60 mallas). La resina de cambio iónico había sido regenerada antes con NaOH al 10% y lavado con agua hasta dejarla libre de álcali inmediatamente antes de su uso. La solución, después de filtrada a través de la columna, se lavó con agua hasta que el volumen total de efluente era de aproximadamente 100 ml. El "efluado" pesaba 0,15 g. después de secado por congelación.

229215

La columna se eluyó luego lentamente con 260 ml. en junto NH_3 0,5 N. Este eluado se concentró en vacío y por último se secó por congelación. Dió 5-6 mg. de un producto pardo ligeramente amarillento (1% = 30, 260 milímetros fósforo = 1%).

El producto dió una reacción de ninhidrina ligeramente positiva y produjo leucocitosis en seres humanos con una dosis de aproximadamente 1 mg.

Describiremos ahora el tratamiento ulterior de un producto obtenido de la manera anteriormente descrita, con vistas a aislarle y purificarle todavía más mediante electroforesis.

Se disuelven 0,169 g. de este material (equivalentes a 14,6 Kg. de hígado fresco) en 7,5 ml. de agua y se colocan en un papel "Whatman 3MM" en un aparato de electroforesis continuo cerca del electrodo negativo, después de añadir 0,25% de tricresol para impedir el desarrollo de microorganismos. Como amortiguador se emplea carbonato sódico 0,025 M. Se aplica un voltaje de 600 voltios, que da una intensidad de corriente de unos 9,5 mili-amperios. La parte del material que se mueve hacia el ánodo y que tiene la máxima absorción ultravioleta a 260 milimicrones contiene el material activo. La solución que contiene esta fracción se concentra en el vacío hasta unos 70 ml. y se pasa a través de una columna que contiene una resina de cambio iónico ácida en forma de hidrógeno (Amberlite IR 120 (H), 2 cm x 11 cm), con lo cual se separa el bicar-

229215

bonato sódico. La columna se lava después con agua hasta
que el efluado muestra poca o ninguna absorción ultravioleta.
Los eluados recogidos se ajustan a pH 6 con solución
de hidróxido sódico, se concentran en vacío y se secan por
5 congelación. Se aíslan 77 mg. de un material muy activo.

Ejemplo 2.

Un extracto de hígado comercial producido
por extracción de hígado fresco con agua caliente y des-
proteinizado por precipitación con alcohol se extrajo de
10 modo normal con fenol acuoso. La fase fenólica se diluyó
con éter y la mezcla se extrajo con agua, y la fase acuo-
sa se precipitó con acetato bórico en presencia de alcohol,
tal como se describe en el Ejemplo 1.

Se disolvieron 110 g. de precipitado bóri-
15 co (equivalentes a 50 Kg. de hígado fresco) en 5,25 litros
de agua. Esta solución se pasó a través de una columna
rellena con resina cambiadora de iones ácida (IR 120 (H),
6 x 50 cm). La columna se lavó con 10 litros de agua. Los
efluados reunidos precipitaron pequeñas cantidades de ma-
20 terial después de dejados reposar. El líquido flotante se
decantó de la precipitación pequeña y se neutralizó a pH
6 con lejía de sosa. La solución se concentró después en el
vacío hasta 2,95 litros. Se añadió alcohol amílico para
impedir la formación de espuma durante la evaporación. A
25 la solución se añadieron 72,5 g. de carbón activo (Norit X);
se agitó y se dejó reposar a la temperatura ambiente duran-
te 19 horas. La solución se filtró por un embudo Büchner

229215

y el carbón se lavó con 3 litros de agua. Los filtrados
reunidos se ajustaron a pH 9,2 mediante solución de hidróxi-
do sódico 2 N y ácido acético diluido. La solución se pasó
después a través de una columna con resina de cambio iónico
5 básica (IR 4B (OH), 6 x 43 cm en forma regenerada) y la
columna se lavó con agua hasta que el efluente ascendía a
11,850 litros. El efluado incoloro tenía una absorción ul-
travioleta a 260 milimicrones de 0,015 y tenía un conteni-
do de sólidos de 4,9 g. por litro. La columna se eluyó lue-
10 go lentamente con unos 18 litros de agua de amoniaco 0,5 N,
que se concentraron en vacío y, finalmente, se secó por con-
gelación. De este modo se obtuvieron 1,128 g. de sólido.
Se disolvieron 0,125 g. de esta sustancia en 5 ml. de agua
y se añadieron 10 microlitros de tricresol. La solución se
15 colocó sobre papel de filtro (Whatman No.3, 3MM) en un apa-
rato de electroforesis continuo con aplicación de amorti-
guador de carbonato sódico 0,025 N y la electroforesis se
efectuó con un voltaje de 300 voltios (8,5-9 microamperios).
El aparato de electroforesis estaba provisto de 20 puntos
20 de escurrimiento y se recogió el número correspondiente de
fracciones en el transcurso de 2 días. La solución se co-
locó sobre papel entre los puntos de escurrimiento 16 y 17.
El ánodo se colocó cerca del punto de escurrimiento num.1,
y el cátodo cerca del punto de escurrimiento num.20. Las
25 fracciones 6 a 12, que mostraban la máxima absorción a 260
milimicrones, se juntaron y se pasaron a través de una co-
lumna con resina cambiadora de iones ácida (IR 120 (H),



229215

2 x 11 cm.), después de lo cual la columna se lavó con
agua hasta que el pH era de 5,5 en el efluado. Los eflua-
dos reunidos se concentraron algo en vacío para separar
el bióxido de carbono y luego se neutralizaron con NaOH
5 2 N. Después de concentrar en el vacío y secar por conge-
lación, la solución dió 30,45 mg. de una sustancia lige-
ramente amarillenta, que en una dosis de 0,64 mg. se in-
yectó intramuscularmente produciendo leucocitosis. Por
ejemplo, 0,64 mg. de esta preparación inyectados intra-
10 muscularmente en una persona sana acusaron el cuadro si-
guiente del efecto de la leucocitosis:

Número de leucocitos por mm³: antes de la
inyección: 8200. A intervalos de una hora después de la
inyección: 9000, 8800, 7800, 14400, 14000, 15600.

15 Esta solicitud que corresponde a la presen-
tada en Noruega el 15 de Junio de 1955 bajo el número
117.539, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vi-
gente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- 0 - N O T A - 0 -

20 Los puntos de invención propia y nueva que
se presentan para que sean objeto de esta solicitud de

229215

Patente de Invención en España por VEINTIDOS años, son los siguientes:

1.^o.- Un procedimiento para obtener una sustancia que produce leucocitosis (el factor de la leucocitosis) a partir de extractos de hígado acuosos, caracterizado por las operaciones de que el extracto hepático acuoso, por adición de álcali, se ajusta a un pH comprendido entre 5 y 10; del extracto se precipita un factor que contiene leucocitosis por adición de un acetato, cuyo catión es uno de los metales del grupo formado por el bario, el calcio o el plomo, y alcohol; el precipitado así formado se separa de la solución; el precipitado se disuelve en agua; la solución acuosa se trata con un cambiador de iones ácido, con lo cual dichos metales y las impurezas son combinados; la solución que contiene el factor de la leucocitosis se separa del cambiador iónico y se trata con un cambiador iónico básico, el cual absorbe o combina el factor de la leucocitosis; este último cambiador iónico se trata con una solución ligeramente alcalina, preferiblemente agua amoniacal diluida, y el líquido así obtenido se emplea como remedio en el tratamiento de las enfermedades del hígado.

2.^o.- Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que de la solución en amoniacal acuosa obtenida finalmente se produce, por evaporación y secado, una sustancia que contiene el factor de la leucocitosis en forma muy enri-

229215

quecida.

5 3º.- Un procedimiento tal como se reivindica en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por la operación de que el extracto hepático antes de precipitación con acetato y alcohol, se ajusta a pH de 8 - 8,4 y preferiblemente de 8,2.

10 4º.- Un procedimiento tal como se reivindica en las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado por el hecho de que como agente precipitante se usa acetato bórico y alcohol.

15 5º.- Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por la operación de que el cambiador iónico básico que ha absorbido el factor de la leucocitosis se trata con agua que contiene amoniaco equivalente a una concentración de 0,1 - 2 N, y preferiblemente de 0,5 N.

20 6º.- Un procedimiento tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por las operaciones de que el precipitado obtenido mediante acetato bórico, acetato cálcico o acetato de plomo y alcohol se descompone con ácido sulfúrico diluido y el sulfato difícilmente soluble así formado se separa de la solución, la cual se trata después posteriormente como se indica.

25 7º.- Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por las operaciones de que la sustancia de actividad

229215

leucocitósica obtenida se fracciona y luego se purifica sometiénola, después de disolución en agua a la que se ha añadido una sustancia amortiguadora alcalina, a electroforesis, con lo que la sustancia activa pasa al ánodo, después de lo cual la solución enriquecida se concentra y se obtiene la sustancia activa.

8º.- Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que durante la electroforesis se usa una sustancia amortiguadora que dá a la solución un pH de 8 - 9, siendo preferiblemente esta sustancia bicarbonato sódico.

9º.- Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado por el hecho de que como material de partida se usa un extracto de hígado producido a partir de hígado de ganado vacuno grande, el cual hígado se ha desproteínizado, con o sin proteólisis previa y se ha extraído con fenol saturado con agua, diluyéndose este extracto con éter y volviendo a extraer la fase fenol-éter con agua.

10º.- Un procedimiento para la preparación de un extracto de hígado acuoso producido como se describe en la reivindicación 9, caracterizado por la operación de que el extracto de hígado acuoso con o sin precipitación previa con acetato bórico, acetato cálcico, acetato de cinc o acetato de plomo, se separa de las impurezas pasándole a través de un cambiador iónico ácido.

27 DIC
229215

11º.- Un procedimiento para el enriquecimiento de un factor de la leucocitosis procedente de un extracto de hígado acuoso producido como se describe en la reivindicación 9, caracterizado por la operación de que el extracto hepático, con o sin purificación previa sobre acetato bórico, acetato cálcico, acetato de cinc o acetato de plomo, y sobre un cambiador iónico ácido, es absorbido en un cambiador iónico básico al agitarlo con éste o pasarlo a su través.

12º.- Un procedimiento para la preparación de un factor de la leucocitosis a partir de un extracto de hígado acuoso producido como se describe en la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que el factor de la leucocitosis se enriquece por precipitación con un acetato, cuyo catión es uno de los metales del grupo que forman el bario, el calcio, el plomo, o el cinc, en presencia de alcohol.

13º.- Un procedimiento para obtener una sustancia que produce leucocitosis (el factor de la leucocitosis) a partir de extractos de hígado acuosos.

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

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

Madrid,

17 DIC 1958

P. Alberto de las Rivas
F. Rivas