

284 006



284 006

MEMORIA DESCRIPTIVA

PARA UNA PATENTE DE INVENCION POR VEINTE AÑOS EN ESPAÑA,
A FAVOR DE SOCIÉTÉ LABORATOIRE CHOAY, DE NACIONALIDAD FRAN
CESA, DOMICILIADA EN PARIS (FRANCIA) 48 Avenue Théophile
Gautier,

a o b r e :

“ PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE
PREPARACION DE SUBSTANCIAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS EN EL
HOMBRE, PARTIENDO DE PROTÍDOS DE ORIGEN ANIMAL, MAS PAR
TICULARMENTE HORMONAS PROTÍDICAS ”.

La presente invención se refiere a un procedimiento de
preparación de sustancias biológicamente activas en el hom--
bre partiendo de protídeos de origen animal; más particularmen
te tiene por objeto un procedimiento de preparación de subs--



tancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de hormonas protídicas animales tales como las hormonas hipofisarias como, en particular, la hormona somatotropa segregada por la antehipófisis.

5. Los estudios llevados a cabo sobre la actividad de las hormonas hipofisarias animales, y en particular de la hormona somatotropa de origen bovino, en el hombre, han permitido establecer que estas hormonas, y más especialmente la última citada, no eran activas o muy poco activas en el hombre.
10. Se han llevado a cabo investigaciones con miras a convertir a la hormona somatotropa bovina, biológicamente activa en el hombre. Estas investigaciones han llevado a sus autores a someter a la hormona somatotropa de origen bovino, a la acción de enzimas proteolíticas del tipo de la alfa-quimotripsina, que provocan una hidrólisis parcial de la hormona; esta hidrólisis parcial da lugar a una sustancia que, introducida en el hombre, posee propiedades biológicas análogas a las que presenta la hormona somatotropa de origen humano.
15. Sin embargo, el procedimiento que acaba de describirse presenta graves inconvenientes, que, hasta el presente, han impedido la puesta en práctica del mismo en el terreno industrial, debido a que las propiedades biológicas frente al hombre, de los productos obtenidos por este procedimiento conocido, no son constantes; en efecto, sometiendo la hormona somatotropa de origen bovino a la acción de enzimas, conforme al procedimiento conocido, se provoca una hidrólisis de la hormona, que permanece parcial en la medida en que se la detiene por medios físicos tales como la congelación, y después liofilización; no obstante, tal detención de la hidrólisis es reversible, porque la --
20. puesta en contacto con un medio acuoso, antes o después de la
- 25.
- 30.



284006

administración, de la sustancia que resulta de la hidrólisis de la hormona mediante acción enzimática, restablece las condiciones favorables, al manifestarse la acción enzimática de la enzima sobre su sustrato y, consecuentemente, la continuación de la hidrólisis de la molécula de la hormona de origen bovino, hidrólisis que puede eventualmente, si no ser total, por lo menos determinar una pérdida parcial o total de la actividad biológica que se busca. En consecuencia, la inconstancia de las propiedades biológicas de las sustancias obtenidas por el procedimiento conocido, se debe al hecho de que este procedimiento no lleva medios que permiten el control de la hidrólisis que resulta de la acción de la enzima sobre la hormona somatotropa.

La presente invención tiene por objeto la obtención de un procedimiento de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de prótidos de origen animal, particularmente de hormonas protídicas animales, del tipo, por ejemplo, de hormonas hipofisarias animales, y más especialmente de la hormona somatotropa, que responde mejor a las necesidades de la práctica que los procedimientos que tienen la misma finalidad, conocidos hasta el momento presente, en especial porque el procedimiento conforme a la invención permite la detención instantáneamente y de forma reversible de la acción de la enzima sobre el prótido, o sobre la hormona protídica de origen animal sometido a la acción citada, de forma que la hidrólisis del prótido o de la hormona tratada, no continúe más allá de la fase que se pretende.

La invención tiene principalmente por objeto establecer un procedimiento de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de prótidos de origen animal, en particular de hormonas protídicas animales, en espe



284006

- cial de hormonas hipofisarias animales, que no son directamente activas en el hombre por sí mismas, tales como, en especial, la hormona somatotropa, mediante hidrólisis de los citados prótidos u hormonas, con ayuda de enzimas proteolíticas apropiadas, cuyo procedimiento se caracteriza porque se procede a la inhibición controlada de la acción de las enzimas sobre los citados prótidos u hormonas, con ayuda de inhibidores apropiados, en forma que se detenga la hidrólisis de estos últimos, de manera irreversible a la fase que se quiere.
- 5.
10. El inhibidor forma con la enzima un complejo que provoca la inactivación de la enzima, lo que da origen a la detención irreversible de la hidrólisis de la molécula del prótido o de la hormona tratada, de forma que la sustancia obtenida por el procedimiento conforme a la invención es biológicamente activa, de manera constante, tanto después de ponerla en solución, como en el momento de su inyección en el organismo, y que la irreversibilidad de la detención de la actividad enzimática, garantiza que no se produzca en momento alguno una reanudación de la actividad de la enzima sobre su sustrato y, por consecuencia, una pérdida de la actividad de la sustancia obtenida, estando el producto obtenido, desprovisto de actividad enzimática.
- 15.
20. Se utiliza como inhibidores, en el procedimiento conforme a la invención, todo inhibidor o grupo de inhibidores, susceptibles de inhibir la enzima que realiza la hidrólisis del prótido o de la hormona tratada. Entre tales inhibidores, se pueden citar los inhibidores químicos tales como los disulfuro fosfatos o inhibidores naturales, que pueden ser bien de origen vegetal (inhibidor de las judías verdes de Lima, de la soja, por ejemplo), bien de origen animal (ovomucoides, inhibidores de peptidasas, extractos de páncreas, de parótidas, de ascárides o
- 25.
- 30.



284006

lombrices intestinales, por ejemplo). Se comprenderá fácilmente que la enumeración que precede ha sido tan sólo a título de ejemplo, sin que tenga carácter limitativo en cuanto a la invención.

5. El completo inhibidor/enzima puede, a voluntad, separarse o no de la sustancia obtenida, poniendo en práctica el procedimiento conforme a la invención, en vista de que su presencia no altera en absoluto las propiedades biológicas de la sustancia obtenida, y tampoco la facultad de esta última a reaccionar, en el curso de la reacción, o de otras operaciones químicas ulteriores.

10. Conforme a una versión de realización particular de la invención, se somete una hormona tal que la hormona somatotropa de origen animal, especialmente bovino, previamente sometida a la acción de una enzima tal como la alfa-quimotripsina -- que realiza la hidrólisis de la citada hormona -- a un tratamiento de inhibición de la acción enzimática de la alfa-quimotripsina, a la fase querida de la citada acción, mediante la introducción de un inhibidor de la alfa-quimotripsina, tal como un diisofluorofosfato, o el inhibidor extraído de las judías verdes de Lima, el inhibidor de peptidasas extraído del páncreas, de las parótidas, de ascárides o lombrices intestinales, etc., por ejemplo.

15. Aparte de las disposiciones que se acaban de mencionar, la invención comprende aún otras que se desprenden de la descripción que se expone a continuación.

20. La invención tiene por objeto, en particular, los procedimientos de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de protidos de origen animal, en particular a partir de hormonas protídicas animales, tales como las

30.



284006

-8

5. hormonas hipofisiarias y, en especial, la hormona somatotropa animal, conformes a la presente invención, así como los elementos adecuados a la realización y a la puesta en práctica de -- sus procedimientos, y los procedimientos de conjunto en los -- que se incluyen los citados procedimientos de preparación de -- sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de -- prótidos de origen animal, tales como hormonas protídicas animales.

10. La invención se comprenderá mejor con ayuda de la descripción que se expone a continuación, en la que se encontrarán ejemplos de realización del procedimiento de preparación -- de sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo -- de prótidos tales como hormonas protídicas animales que no son directamente activas en el hombre, en especial de hormonas hipofisiarias animales tales como, en particular, la hormona somatotropa.

15. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que estos ejemplos se facilitan únicamente a modo de ilustración de la invención, sin que en modo alguno tengan carácter limitativo.

20. EJEMPLOS

I - 2 g (40.000 U) de una hormona somatotropa de origen bovino, graduando 20 U Evans por mg (Unidad definida sobre la rata hipofisectomizada de 100 g), se disuelven en 95 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH 8, a 25°C. Se disuelve 25. 4 mg de alfa-quimotripsina en 5 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH 8 a 25°C. Se mezclan estas dos soluciones y se mantiene a 25°C durante 30 minutos, en agitación constante. Se añade entonces la cantidad suficiente de inhibidor de peptidase extraído del páncreas del buey, graduado respecto a la alfa-quimotripsina utilizada para realizar la hidrólisis enzimá-

30.



284006

5. tica. En este caso es de 3 mg de inhibidor cristalizado. La preparación se liofiliza en seguida. La sustancia obtenida contiene 24.000 U Evans; el rendimiento es de 60 %.

10. II - 2 g (40.000 U) de una hormona somatotropa de origen bovino, graduando 20 U Evans por mg (Unidad definida sobre la rata hipofisectomizada de 100 g) se disuelven en 95 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH 8, a 25°C. Se disuelven 4 mg de alfa-quimotripsina en 4 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH 8 a 25°C. Se mezclan estas dos soluciones y se mantiene a 25°C durante 30 minutos, en agitación constante.

15. Se añade entonces la cantidad suficiente de inhibidor de peptidasa extraído de parótidas de buey, dosificado o graduado respecto a la alfa-quimotripsina utilizada para realizar la hidrólisis enzimática. En este caso es de 12 mg de inhibidor. La preparación se liofiliza en seguida. La sustancia obtenida contiene 24.000 U Evans; el rendimiento es de 60 %.

20. III - 2 g (40.000 U) de una hormona somatotropa de origen bovino, graduando 20 U Evans por mg (Unidad definida sobre la rata hipofisectomizada de 100 g), se disuelven en 95 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH 8, a 25°C. Se disuelven 4 mg de alfa-quimotripsina en 5 ml de agua destilada bicarbonatada sódica con pH a 25°C. Se mezclan estas dos soluciones y se mantiene a 25°C durante 30 minutos, en agitación constante.

25/ 30. Se añade entonces la cantidad suficiente de inhibidor extraído de las judías verdes de Lima, dosificado respecto a la alfa-quimotripsina utilizada para realizar la hidrólisis enzimática. En este caso es de 10 mg de inhibidor cristalizado. La preparación se liofiliza en seguida. La sustancia obtenida con

284006 -8



tiene 15,000 U Evans; el rendimiento es de 37'5 %. Las diferencias de rendimiento y de dosificación observadas en este caso provienen verosimilmente de la mala solubilidad del inhibidor extraído de las judías verdes de Lima, en las condiciones de la operación.

5.

De los ejemplos que preceden resulta que cualesquiera - que sean los modos de realización y de aplicación adoptados, - se obtiene un procedimiento de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, partiendo de prótidos de origen animal tales como hormonas de origen animal, en especial de hormonas protídicas, y en particular de hormonas hipofisarias animales, que no son directamente activas en el hombre por sí mismas, tales como, en especial la hormona somatotropa, cuyas características se deducen suficientemente de cuanto precede, sin que haya necesidad de precisiones suplementarias.

10.

15.

El procedimiento de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, y desprovistas de actividad enzimática, partiendo de prótidos de origen animal, es especial de hormonas protídicas animales, en particular hormonas hipofisarias, y en especial la hormona somatotropa, presenta ventajas efectivas respecto al procedimiento anteriormente conocido, con el mismo fin, y en especial la de permitir la obtención de sustancias cuyas propiedades biológicas permanecen constantes y no se perjudican por la introducción del inhibidor de la acción enzimática a la que se someten las hormonas.

20.

25.

De la misma forma que esto se desprende de cuanto precede, la invención no se limita en absoluto a los modos de aplicación o a los modos de realización que se han expuesto más detalladamente; por el contrario comprende todas las variantes, - sin que por ello se salga del ámbito o de la esencia de la in--

30.

284606



vención.

NOTA

En resumen: la invención recae sobre las siguientes reivindicaciones:

5. 1ª.- Perfeccionamientos en los procedimientos de preparación de sustancias biológicamente activas en el hombre, y desprovistas de actividad enzimática, partiendo de proteínas de origen animal, en particular partiendo de hormonas de origen animal, en especial hormonas proteídicas, y en particular hormonas hipofisarias animales que no son directamente activas en el hombre por sí mismas, tales como notablemente la hormona somatotropa, mediante hidrólisis de las citadas hormonas, con ayuda de enzimas proteolíticas adecuadas, que se caracterizan porque se precede a la inhibición controlada de la acción de las enzimas sobre los citados proteínas u hormonas, con ayudado de inhibidores apropiados, en forma que se detenga la hidrólisis de estos últimos, de forma irreversible, en la fase que se desea.
10. 2ª.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1ª, caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibidor químico.
15. 3ª.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1ª, caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un diso- fluorofosfato.
20. 4ª.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1ª, caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibidor natural.
25. 5ª.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1ª, caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibidor natural de origen animal.
30. 6ª.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1ª,

284006



caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibi-
dor extraído de páncreas.

5. 7^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibi-
dor de peptidasas extraído de parótidas.

8^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibi-
dor de peptilasas extraído de los ascáridos.

10. 9^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es de ovomu-
coide.

10^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es un inhibi-
dor natural de origen vegetal.

15. 11^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es el inhibi-
dor de las judías verdes de Lima.

20. 12^a.- Perfeccionamientos conforme a la reivindicación 1^a,
caracterizados porque el inhibidor que se utiliza es el inhibi-
dor de la soja.

25. 13^a.- Perfeccionamientos conforme a las reivindicaciones
1^a a 12^a, caracterizados porque se calcula la cantidad de inhi-
bidor que se ha de utilizar en el procedimiento, graduando o do-
sificando respecto a la cantidad de enzima utilizada, para hi-
drolizar parcialmente la hormona de origen animal, y porque la
cantidad de inhibidor que se utiliza realmente no debe ser infe-
rior a esta cantidad calculada.

30. 14^a.- Perfeccionamientos conforme a las reivindicaciones
1^a a 13^a, caracterizados porque se determina el momento en el --
que se procede a la introducción del inhibidor en el medio, en

284006



función de la cantidad, del tiempo de la acción, del pH y de la relación entre la cantidad de enzima y la cantidad de sustrato tratada.

5. 15ª.- Perfeccionamientos conforme a las reivindicaciones 1ª a 14ª, caracterizados porque la enzima que se somete a tratamiento de inhibición es la alfa-quimotripsina.

10. 16ª.- Perfeccionamientos conforme a las reivindicaciones 1ª a 15ª, caracterizados porque la hormona que se trata es una hormona somatotropa de origen animal, por ejemplo el bovino.

15. 17ª.- PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE PREPARACION DE SUBSTANCIAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS - EN EL HOMBRE, PARTIENDO DE PRÓTEÍDOS DE ORIGEN ANIMAL, MAS PARTICULARMENTE HORMONAS PROÉNDICAS.

Según se describe en esta memoria que consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 8 ENE 1963

CARLOS FERNANDEZ CANDELAS

R.P.

RECEIVED