



288493

PATENTE DE INVENCION

Ref: 111/St.

Memoria Descriptiva 288493

sobre:

"Procedimiento de obtención de hormonas gonadotrópicas pituitarias, a partir de la orina".

Solicitante:

INSTITUTO FARMACOLOGICO SERONO S.p.A., entidad italiana, residente en Via Casilina, 125, Roma Italia.

Las distintas preparaciones dotadas de actividad gonadotrópica o gonadotrófica que se encuentran en el mercado, son el resultado de la investigación que permite llegar a la conclusión

5. de que la hipófisis humana y de los animales su -

288493

29 MAY.



5. periores, elabora y secretados factores gonadotrópicos, de distinta actividad. Uno de ellos se denomina FSH (hormona folicular estimulante) y el otro, "ICSH o factor LH" (hormona estimulante de las células intersticiales u hormona luteinizante).

Tres distintos tipos de productos dotados de actividad gonadotrópica se encuentran actualmente en producción; son los siguientes:

10. (1) La hormona gonadotrópica coriónica, extraída de la orina de las mujeres embarazadas y que biológicamente corresponde al factor LH.

15. (2) La hormona gonadotrópica del suero, que se extrae del suero de yeguas embarazadas y cuya actividad corresponde a la vez a los factores FHS y LH.

20. (3) La hormona gonadotrópica pituitaria que se extrae de la hipófisis de animales tales como las ovejas, caballos y cerdos, cuya actividad se revela a la vez en el sentido FHS o LH.

25. (4) Las hormonas gonadotrópicas extraídas de la orina de mujeres en estado menopáusico, cuya actividad biológica corresponde a los dos factores FHS y LH juntos. El procedimiento de extracción y purificación de esta hormona, que desde ahora se denominará HMG (gonadotropina menopáusica humana) ha constituido ya el objeto de una patente presentada en Italia el 31 de mayo de 1.960, nº 45/80.

30. Todos los productos antes citados dota-

288493



- 3 -

- dos de actividad gonadotrópica, presentan, más o menos, inconvenientes bastante serios. En realidad, el efecto biológico de la hormona gonadotrópica coriónica (HCG o gonadotropina coriónica humana) es exclusivamente el del tipo LH, y por tanto, esta hormona es evidentemente utilizable tan solo para el tratamiento de distintas afecciones para las cuales es innecesario el tipo FSH de actividad. Por el contrario, se sabe que las gonadotropinas serica o pituitaria, o sea, las que no son de origen humano, tienen la capacidad de provocar, después de un tratamiento de inyecciones repetidas a individuos humanos, durante un cierto período de tiempo, la formación de anticuerpos o antihormona específicos, capaces de inhibir la acción de administraciones sucesivas de la misma hormona.
- 5.
- 10.
- 15.

- La hormona gonadotrópica, extraída de orina post-monopausia, y que constituye el objeto de una patente anterior de los mismos solicitantes, a pesar de su buen efecto terapéutico contiene también impurezas que limitan su utilidad terapéutica en aquellos casos en que se precisan dosis considerables de hormona. La HMG citada es tan impura que realmente no puede utilizarse como modelo eventual de estructura química para el estudio de una síntesis de la molécula de la hormona u hormonas gonadotrópicas pituitarias. Por la misma razón (o sea a causa de la cantidad excesiva de impurezas), la HMG citada
- 20.
- 25.
- 30.

288493



5. no puede usarse para el estudio inmunológico eventual de las gonadotropinas, que trata de aclarar los problemas relativos a la determinación cualitativa y cuantitativa de los factores FHS y LH en los líquidos humanos (por ejemplo plasma, suero, orina, etc).

10. El objeto de este invento es proporcionar un procedimiento que partiendo de un material fácilmente disponible, permita la obtención de una hormona urinaria, gonadotrópica y hipofisaria humana, con actividad FSH predominante y con actividad LH, exenta de propiedades antigenas cuando se inyecta en el cuerpo humano, susceptible de estimular los ovarios humanos (como han demostrado varios autores)

15. de provocar la ovulación y el embarazo en casos de amenorrea primaria o secundaria de gran duración, debida a insuficiencia de gonadotropinas pituitarias,

20. Esta preparación, merced a su elevado nivel de pureza, puede utilizarse solamente para estudiar la estructura de la molécula o moléculas que constituyen la hormona gonadotrópica humana. Este estudio conduciría a la

25. posibilidad de una completa síntesis o de una transformación de distintas cadenas pépticas de gonadotropinas pituitarias animales, con objeto de hacer éstas últimas análogas o estructuralmente iguales a las gonadotropinas pituitarias humanas. Finalmente, esta preparación,

30.

288493



puede ser útil para la preparación de los ingredientes necesarios para la determinación inmunológica cualitativa y cuantitativa de FHS y LH en líquidos humanos tales como plasma, sue-

5. ros, orina, etc. (anti-suero de conejos, ovejas, caballos u otros animales adecuados y como ingredientes necesario para revestir corpusculos de seres humanos o de moruecos u otras clases similares, o bien para el revestimiento de partículas de latex u otros materiales orgánicos e inorgánicos, adecuados para el objeto).
- 10.

El objeto de este invento es, a la vez, modificar y completar el procedimiento de preparación descrito en la patente citada, así

15. como definir con precisión, las etapas del método que se emplea para la extracción y purificación de HMG, o sea el procedimiento de acuerdo con este invento, para la preparación de hormonas gonadotrópicas pituitarias, extraídas de orina menopáusica y post-menopáusica. Hay
20. que hacer hincapié en que de acuerdo con el procedimiento objeto de este invento, la orina menopáusica o post-monopáusica, después de adicionarle ácido acético glacial para ajustar el
25. pH entre 4,2 y 4,5, se sacude con una suspensión acuosa de 20 % de kaolín activado y celita.

El kaolín + celita, se separa, se lava con agua acidificada a un pH de 4,5 con ácido acético, se extrae con solución acuosa de

- 30.



288493

- amoníaco a un pH comprendido entre 11 y 11,3 - inclusive, se centrifuga, el pH se ajusta nuevamente a 8,3 - 8,7 por medio de ácido acético; el precipitado en estas condiciones formado se
5. se separa, se agrega nuevamente ácido acético hasta alcanzar un pH comprendido entre 5 y 5,5 y se obtiene un precipitado con acetona, que se filtra y se seca. El precipitado bruto obtenido,
10. se lava con etanol al 95 %, se extrae con etanol al 70 %, que contenga 10 % de acetato amónico, y el extracto claro de este modo obtenido se precipita con etanol absoluto que contenga 10 % de acetato amónico. El precipitado se recoge y se lava con etanol al 95 % y con
15. agua.

- El precipitado lavado se disuelve - con un amortiguador de fosfato al 0,05 %, de un pH igual a 7, se agita con dietil-aminoetil-celulosa, y el filtrado claro, que se ha
20. solidificado a un pH de 5,4 con ácido acético glacial, se hace pasar a través de una columna de permutita previamente tratada con amoníaco 1N y luego con ácido acético 1N; a continuación agua, y finalmente se equilibra con
25. 0,05M de acetato amortiguador, al pH de 5,4. Después de absorber el HMG en permutita, se lava con 0,05M de acetato amortiguador, a un pH de 5,4, hasta que la densidad óptica del efluente, E280 mμ, sea aproximadamente cero, y
30. luego el HMG se eluciona con etanol al 40 % -

288493



- que contenga 10 % de acetato amónico. El producto de alcohol elucionado, se precipita con etanol al 95 %, se centrifuga, se lava con etanol absoluto y luego con éter, y se seca. Para
5. una purificación ulterior del HMG obtenido, se disuelve con agua destilada, y se filtra a través de una columna preparada con Sephadex G 200 (Pharmacia firm, Upsala-Suecia) suspendido en agua destilada. Las primeras fracciones de
 10. producto saliente, se recogen y luego se liofilizan. Estas filtraciones en Sephadex gel, se realizan a una temperatura de 4-5°C.

- Para la extracción de las hormonas gonadotrópicas de acuerdo con el procedimiento
15. que se describe en este invento, la orina menopáusica o post-monopáusica, se recoge en recipientes de vidrio o material plástico, que contengan ácido acético glacial en cantidades suficientes para asegurar que el pH de la orina
 20. será de 4 a 4,5. El objeto de esta acidez es el evitar el crecimiento de gérmenes.

- Por la denominación de kaolín activo,
- se indica un caolín previamente tratado del modo siguiente: el kaolín se lava con una solución normal de ácido clorhídrico, se deja en
25. reposo, se decanta el líquido que flota, y el kaolín se lava repetidamente con agua, para eliminar el ácido clorhídrico.

- La dietilaminoetil-celulosa, se trata
30. ta previamente con ácido clorhídrico 0,5N y

288493



- 8 -

luego con hidrato sódico 0,5N y a continuación con fosfato amortiguador 0,05M a un pH de 7.

- La permutita utilizada de acuerdo con este invento, puede tratarse previamente para corresponder a una granulación determinada (se elige la fracción que atraviesa el tamiz de 50 mallas (por pulgada lineal) y quede retenida por un tamiz de 76 mallas) y se lava luego con ácido acético por decantación; a continuación se lava con agua y se seca.
- 5.
- 10.

- Debe tenerse presente que en la purificación cromatográfica del extracto en permutita, la concentración de acetato amónico y el grado de alcohol etílico indicados para la elución de HMG, son solamente valores aproximados, y si se desea, pueden aumentarse o disminuirse, entre ciertos límites.
- 15.

- El procedimiento de este invento permite la obtención de hormonas gonadotrópicas con efecto FSH dominante, dotadas de las siguientes actividades biológicas:
- 20.

Actividad gonadotrópica total (ensayo en útero de ratones)

1 mg = 141 mg equivalente de I.R.P.

25. FSH (ensayo de aumento en ratones)

1 mg = 621 mg equivalente de I.R.P.

LH (peso prostata ventral. Ratones hipofisectomizados)

1 mg = 115 mg equivalente de I.R.P.

30. Los efectos biológicos se han deter-

288493



- 9 -

minado de acuerdo con los métodos y se expresan en términos de I.R.P. - HMG (preparación internacional de referencia de gonadotropina humana menopáusica) como se explica a continuación.

5. El efecto total gonadotrópico, se ha determinado de acuerdo con el método descrito - por Loraina, J.A., Brown, J.B., J. Endocrinol 18:77, 1959.

10. El efecto de FHS se ha determinado de acuerdo con el método descrito por Steelman, - S.L., Pohley, Florence, M., Endocrinology 53: 604, 1953.

15. El efecto LH se ha determinado de acuerdo con el método descrito por Loraina, J.A. Brown, J.B. Acta Endocrin. 17:520, 1.954.

20. Los resultados de las determinaciones biológicas se calculan de acuerdo con Gaddum - J.H., Pharm. Lond. 6:345, 1953 y Borth, R., Diz zafalusy, E., Heinrichs, H.D., Arch. für Gynaekol. 188:497, 1957.

En los ejemplos siguientes, no limitativos, se indica un método preferible para la aplicación de este invento.

25. EJEMPLO - Un volumen de 1083 litros de orina post-menopausia se ajusta, con ácido acético glacial, a un pH de 4,5 y se agita durante alrededor de una hora con 5,414 kg de celita y 54,15 litros de suspensión de kaolín al 20 %; el kaolín y la celita se deja que se posen durante la noche, a la temperatura ambiente.

30.

288493



- 10 -

- El líquido claro superior se desecha, y el kaolín y la celita se centrifugan. El precipitado se lava dos veces con agua acidulada a un pH de 4,5 con ácido acético, y luego se somete
5. dos veces a la elución con amoníaco acuoso 1M, con objeto de que el pH del producto elucionado sea de 11 a 11,3. Los resultados de la elución se elevan a un pH de 8,5 con ácido acético y, después de separación por centrifugación
10. del precipitado formado, el líquido claro obtenido se acidifica a un pH de 5 a 5,5 con ácido acético glacial y luego se añaden al mismo dos volúmenes de acetona. El precipitado se deposita durante la noche y el líquido claro que sobranada se desecha. El precipitado se lava
15. con acetona, por decantación, luego se introduce en un filtro Buchner y se lava con etanol al 95 % y con éter etílico, y finalmente se seca sobre cloruro cálcico anhidro, a presión
20. reducida.

El rendimiento de kaolín-acetona bruto (fracción A) es de 83,88 g.

- La fracción A (83,85 g) se extrae dos veces con 2,516 litros y 1,680 litros de
25. etanol al 70 % que contenga un 10 % de acetato amónico; cada vez se agita durante alrededor de una hora. Se añaden al extracto claro obtenido de la filtración, dos volúmenes de etanol absoluto que contengan 10 % de acetato amónico.
30. El precipitado se deja posar durante la no

288493



- 11 -

- che, y el líquido que sobranada se desecha, recogién^{do}se a continuación el precipitado por - centrifugación, lavándose con etanol al 95 % y éter etílico, y secándose, con lo cual se obtieⁿen 7,527 g de fracción B. Los 7,2 g de frac^{ci}ón B equivalentes a 1037 litros de orina, se disuelven en 720 ml de fosfato amortiguador - 0,05M, de un pH de 7. La solución marrón inten^{so}, se agita durante 10 minutos con 72 g de -
5. DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa), pre^{vi}amente lavado con ácido clorhídrico 0,5N, lue^{go} con hidrato sódico 0,5N y después con agua - destilada, y finalmente con fosfato amortigua^{do}r 0,05M, de un pH de 7. La DEAE-celulosa se
10. separa del líquido, por filtración, a través de un Buchner y luego se lava con dos veces 720 ml de fosfato amortiguador 0,05M de pH = 7. Los - filtrados mezclados, en estas condiciones ya - perfectamente claros y de un color amarillo pá^lido, se acidifican a un pH de 5,4 con ácido - acético glacial y luego se enfrían a 4-5°C. La cromatografía sobre permutita se hace del modo siguiente: la permutita se coloca en una colum^{na} de 3 x 20 cm y se lava con amoniaco IN, lue^{go} con ácido acético IN, y luego finalmente se
20. equilibra con fosfato amortiguador 0,05M, de pH igual 5,4; la cromatografía se realiza en una - habitación refrigerada a 4-5°C. El líquido cla^{ro} obtenido después del tratamiento con DEAE-ce^lulosa, se filtra a través de la columna y se -
25. 30.

288493



lava con acetato amortiguador 0,05M de pH = 5,4, hasta que la densidad óptica E280 mμ sea próxima a cero. Las proteínas absorbidas en la permutita, se elucionan con etanol al 540%

- 5. que contenga 10 % de acetato amónico, y se recogen alrededor de 350 ml de producto de elución. Este líquido casi incoloro, se añade con agitación a 2,5 volúmenes de etanol enfriado a 2-4°C. El precipitado se deja reposar durante la noche a 2-4°C. El líquido claro que sobrenada se desecha, y el precipitado se recoge por centrifugación, se lava con etanol absoluto y luego con éter etílico, y se seca. Así se obtienen 290 mg de fracción C.

- 10.
- 15. De acuerdo con el método de extracción y purificación, se han preparado otras tres cantidades, ver tabla 1.

TABLA 1

Partida	Orina litros	Fracción A mg/l	Frac - ción B. C mg/l	Fracción mg/l
20. P-25 E32	1083	97,4	6,95	0,28
P-25 E35	16245	97,4	8,72	0,703
P-25 E38	59877	97,4	10,33	0,595
25. E-26 E43	68862	83,0	15,18	0,45

Las características biológicas de los cuatro grupos, se indican en la tabla 2.



TABLA 2

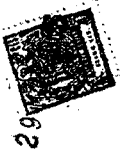
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES A-C EN FUNCIÓN DE INF-EGC
Preparación de referencia empleada Norma internacional propuesta

Ensayo con útero de ratón
Ensayo de sumación

EGC (Fergomal-23)

Peso prostata ventral, ensayo rata hipofisiectomizada.

Ensayo con útero de ratón		Ensayo de sumación		Peso prostata ventral, ensayo rata hipofisiectomizada.			
Tipo	H λ	R.F.	F.I.	Tipo	H λ	R.F.	P. 55
			P = 0.95				P = 0.95
<u>Fración A.</u>							
P-25	E32	242	20	0.10	0.64	0.50-0.86	
P-25	E33	242	20	0.10	0.64	0.50-0.86	
P-25	E34	242	20	0.10	0.64	0.50-0.86	
P-25	E43	242	20	0.11	0.76	0.58-0.97	
<u>Fración C.</u>							
P-25	E32	242	20	0.12	74.5	54.4-130	242 20 0.08 466 39-557
P-25	E35	242	20	0.13	27.7	21.7-45.1	242 20 0.1 136 242-238
P-25	E36	242	20	0.14	35	22.8-60.3	242 20 0.20 207 242-618
P-26	E43	242	20	0.13	55.5	37 - 80	242 20 0.08 284 242-330
							242 20 0.46 91 31.7 - 1088
							242 20 0.28 44.6 24.6-101.4
							242 20 0.23 35.2 25.6-58.5
							242 20 0.17 69.6 46.5-111.6





Como puede observarse en las tablas 1 y 2, la potencia biológica y la recuperación de la actividad biológica, varían de una partida a otra.

5. Es interesante observar y se reivindica por tanto, que la fracción C tiene un índice elevado de discriminación entre los factores FSH y LH, o sea, que la fracción tiene el factor FSH predominantemente. Algunos experimentos realizados, cuyos resultados no se han publicado todavía, han demostrado que durante la cromatografía sobre permutita, se presenta una pérdida de LH; por esta razón en la fracción C existe un efecto predominante de FSH. Este punto es de gran importancia, ya que se ha demostrado que el efecto FSH de la gonadotropina humana, es el que resulta necesario para la estimulación ovárica, y, por otra parte, el que puede obtenerse solamente bien del modo indicado por este invento, o bien por extracción "post-mortem" de la hipótesis humana. Como factor gonadotrópico de actuación LH, necesario para la transformación del folículo en el cuerpo lúteo, y por tanto para la ovulación, puede usarse también la HCG (gonadotropina coriónica) ya que tiene una acción similar o igual a la del ICSH, extraída de la hipótesis humana o de la orina post-menopáusica.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

- Para una purificación ulterior del HMG, se ha llevado a cabo una filtración en Sephadex G 200 de tamaño comprendido entre 140-400 mallas.
- 30.

288493



- 15 -

5. El Sephadex G 200 se suspende en agua -
destilada y se lava por decantación, 3 o 4 veces,
con agua y luego se desechan las fracciones más
finas. El gel de Sephadex, se coloca en una colum
na de 107 x 0,9 cm. La cromatografía se realiza
en una cámara refrigerada de 4 a 6°C.

10. La densidad óptica E280 m μ del efluente
se mide con un espectrofotómetro Beckman DU. La -
velocidad del efluente se regula a 1 ml/hora. El
HMG se disuelve en H₂O. La filtración en el gel,
precisa unas 48 horas. Después de determinarse la
densidad óptica E280 m μ se congelan todas las -
fracciones recogidas y finalmente se liofilizan.

15. A continuación figura un ejemplo de pu-
rificación de fracción C utilizando la cromatogra
fía en Sephadex G 200.

20. Como material de partida, se ha utiliza
do (ver tabla 2) la fracción C del Pergonal-26 lo
te E43, preparado de un volumen de 68,862 litros
de orina post-menopausia.

25. Se disuelven 60 mg de fracción C en 1
ml de agua, y la solución se coloca dentro de la
columna cromatográfica. La filtración del gel se
realiza mediante agua destilada. El efluente se -
regula a 1 ml/hora. Cuando la densidad óptica -
E280 m μ es superior a cero se recoge el efluente,
hasta llegar a 57,4 ml.

30. Después de determinarse el E280 m μ , las
distintas fracciones del efluente se congelan y -
conservan a -25°C, antes de la liofilización.

288493



ACLARACION DE LA FIGURA ADJUNTA.

Como puede observarse en la fig. 1, - existe un máximo solamente.

Cromatografía de la fracción C de Per-

- 5. Cromatografía de la fracción C de Per-
gonal-26 E43 en Sephadex G 200.
Densidad óptica E280 μ : ...
Actividad biológica (útero de rata) recuperación
..... 96 %
Actividad biológica (ensayo de aumento)
- 10. recuperación 88 %
Recuperación proteínica 100 %

En experiencias anteriores, se compro-
bó que utilizando la cromatografía de HMG en Se-
phadex G 75 y DEAE-Sephadex, la mayor parte de
15. la actividad biológica se concentraba en las pri-
meras fracciones del efluente. Por esta razón, -
se mezclaron las fracciones 1 a 10 (31,6 ml de
efluente). Fracciones 11 a 12 (16,9 ml de efluen-
te), Fracciones 13 a 15 (8,9 ml de efluente), y
20. estas fracciones mezcladas se liofilizarón.

- Fracción 1-10 rendimiento después de
20. liofilización 17,5 mg de
proteína
- Fracción 11-12 rendimiento despues de
- 25. la liofilización 13,3 mg de
proteína
- Fracción 13-15 rendimiento después de
- la liofilización 3,2 mg de
proteína

30. La actividad biológica de estas frac-



282A93

TABLA 3

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G200 EN FUNCION DE IEP-HMG.

Preparación de referencia empleada, Personal-23

Materiales ensayados	Ensayo útero rata			Ensayo aumentado			Peso próstata ventral, ensayo rata hipofisectomizada.		
	Tipo N	λ	E.P. F.I. P = 0.95	Tipo N	λ	E.P. P = 0.95	Tipo Y	λ	E.P. F. L. P = 0.95
Material de partida P-26 E4 3C	242	20	0.13 55.5 37 - 80	242	20	0.08 264-330	242	20	0.17 69.6 46.5-111.6
Fraciones 1-10	242	20	0.1 140.8 108-134	242	20	0.09 621-868	242	20	0.28 115.6 69.6-134
Fraciones 11-12	242	20	0.13 18.7 12.3-30	242	20	0.12 70-110.4	242	20	0.18 30 14 - 603

Fraciones 13-15 Inactividad a los niveles de dosis usados.



288493



Como se indica en la tabla 3 la potencia de las fracciones 1-10, bien por el ensayo de útero de rata o bien por el ensayo de aumento es aproximadamente, 2,5 veces superior al del material de partida.

5.

La recuperación total (fracciones 1 a 10 y 11 a 12) de la actividad biológica, es igual al 96 % con respecto a la actividad del material de partida.

10.

El 74 % de la actividad biológica del material de partida, se concentra en los primeros 31,6 ml del efluente, mientras que en las fracciones 11-12 se encuentra solamente el 22 % de la actividad biológica, y las fracciones 13 a 15 son completamente inactivas.

15.

La caracterización del componente proteínico de las fracciones 1 a 10, obtenida por cromatografía en Sephadex G200, como se describe en el ejemplo citado, se obtuvo por medio de inmunelectroforesis, de acuerdo con el método descrito por Lunenfeld B. Iseraky C.

20.

Shelesnyak M.C., J. Clin. Endocrinology & Metab. 22:55, 1962.

25.

En la placa utilizada para la inmunelectroforesis, además de las Fracciones 1-10, se colocaron también suero humano normal y un HMG - Pergonal-23 menos puro, que tenía una potencia gonadotrópica total de 16 mg equivalente de I.R. P., con objeto de comparar la movilidad electroforética de las distintas fracciones proteínicas.

30.



238493

Los anti-sueros utilizados, fueron como sigue:
 1º anti-suero de conejo, contra suero proteínico humano total; 2º anti-suero de conejo contra HMG (Pergonal-23). A continuación figuran los -
 5. resultados de los análisis inmunolectroforéticos.

Las Fracciones 1 a 10, con el anti -
 suero de la proteína del suero humano total, -
 presenta dos líneas de precipitina en la región
 10. de la albúmina, pero el centro de estas líneas no corresponde al de la albúmina. Existe una -
 tercera línea difícilmente visible, que quizá coincida con la línea de la albúmina. Luego, -
 existen dos líneas en la región de α_2 -, y una
 15. línea en la región de la β -globulina.

La misma fracción 1-10 con el antisue-
 ro Pergonal 23 o anti-pergonal, proporciona dos
 líneas claras, cuyos centros están en la región
 comprendida entre β - y α -, y una en la región
 20. β y finalmente, 1 línea en la región α_1 , mien-
 tras que el Pergonal-23, o sea el HMG menos pu-
 ro, proporciona 8 líneas de precipitina.

NOTA

Descrita suficientemente la naturale-
 25. za del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuan-
 to no alteren su principio fundamental. También
 30. se hace constar que el invento corresponde a

288493



una solicitud de patente presentada en Italia -
con fecha 11 de marzo de 1.963 bajo el nº 83/78
acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que
conceden los Convenios Internacionales en vigor
5. y siendo lo que constituye la esencia del refe-
rido invento y por lo que se solicita Patente
de Invención por 20 años, en España "Procedi -
miento de obtención de hormonas gonadotrópicas
pituitarias, a partir de la orina"; caracteri -
10. zándose por lo siguiente:

1ª.- "Procedimiento de obtención de
hormonas gonadotrópicas pituitarias, a partir -
de la orina" especialmente de orina menopáusic
o post-menopáusic, caracterizado por el hecho
15. de que el producto resultante presenta un efec-
to FSH, hormona estimulante del folículo-predom-
inante, con un índice de discriminación FSH:LH
comprendido entre 3 y 6.

2ª.- Procedimiento, según reivindica
20. ción 1ª, caracterizado por que la orina menopáu
sica o post-menopáusic, se agita, a un pH com-
prendido entre 4 y 4,5, conseguido por medio de
ácido acético glacial, con una suspensión acuo-
sa de alrededor del 20 % de kaolín activado; es
25. te se separa, se lava con agua acidificada con -
ácido acético, de un pH de 4,5, se extrae con
amoníaco de tal modo que el pH se ajuste entre
11 y 11,3, se centrifuga, el pH se ajusta de -
nuevo a 8,5 aproximadamente, por medio de ácido
30. acético; el precipitado se separa, se acidifica

288493



- con ácido acético a un pH de 5-5,5 se precipita con acetona, se filtra y se seca, se lava con etanol al 95 %, con éter, se seca, se extrae con etanol al 70 % que contenga 10 % de acetato amónico, el extracto se precipita con etanol absoluto que contenga 10 % de acetato amónico, se disuelve en fosfato amortiguador 0,05M de pH = 7, se agita con dietilaminoetil-celulosa y el líquido purificado, acidificado a un pH de 5,4 con ácido acético glacial, se hace pasar a través de una columna de permutita equilibrada con acetato amortiguador 0,05M de pH = 5,4 hasta que la densidad óptica E.280 μ es próxima a cero, se diluye con etanol al 40 % que contenga 10 % de acetato amónico, se precipita con etanol al 95 % y el precipitado se lava luego con etanol absoluto y éter; se disuelve en agua destilada y se filtra a través de una columna preparada con Sephadex G 200, se recogen las primeras fracciones y el efluente se liofiliza.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- 3.- Procedimiento, según reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que como kaolín activado, se utiliza el siguiente: el kaolín se lava con una solución normal de ácido clorhídrico; luego se deja posar; el líquido sobrenadante se decanta y el kaolín se somete a lavados repetidos con agua.
- 25.

- 4.- Procedimiento, según reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que como dietilaminoetil-celulosa se utiliza una dietilami-
- 30.

288493



noetil-celulosa se utiliza una dietilamonoetil-celulosa que previamente se trata con 0,05M de ácido clorhídrico, y luego con hidrato sódico - 0,5N y, finalmente, con 0,05M de fosfato amortiguador, de pH = 7.

5. 5ª.- Procedimiento, según reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que como permutita se utiliza una permutita previamente tratada para alcanzar finalmente una granulometría determinada; la permutita se lava por decantación con ácido acético y luego con agua, y finalmente se seca.

15. 6ª.- Procedimiento según reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que la filtración a través de una columna preparada con Sephadex G 200, se realiza a una temperatura de 45°C.

20. 7ª.- Procedimiento, según reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que la adificación de la orina para alcanzar un pH de 4 a 4,5, se obtiene por medio de ácido acético glacial.

25. 8ª.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que el producto resultante presenta las actividades biológicas siguientes: Actividad gonadotrópica total (ensayo en útero de rata) 1 mg = 141 mg equivalente de I.R.P. - FHS (ensayo aumento ratas) 1 mg = 621 equivalente de I.R.P. LH, peso próstata ventral, ratas -

30.



288493

hipofisectomizadas, 1 mg = 115 mg equivalente de I.R.P.

5. 9*.- "Procedimiento de obtención de hormonas gonadotrópicas pituitarias, a partir de la orina"; tal y como queda substancialmente descrita en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta memoria consta de ventitres hojas escritas a máquina por una sola cara.

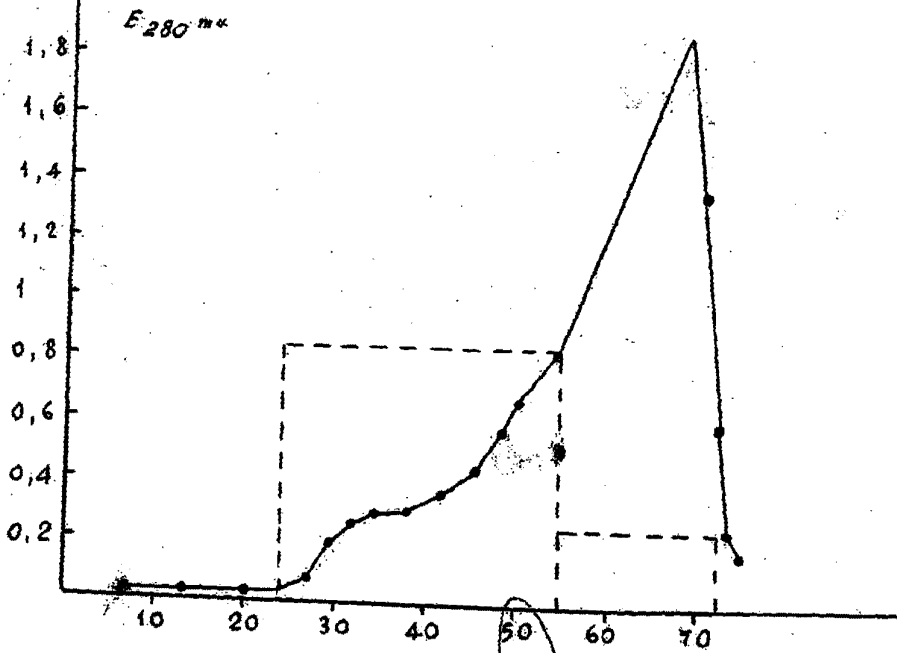
Madrid, 29 MAY. 1953
INSTITUTO FARMACOLOGICO SERONO,
S.p.A.,

J. GOMEZ ACEBO Y MODER

ESCALA VARIABLE



288493



1-10 11-12 13-15

[Handwritten signature]

Madrid, 29 MAY 1957
INSTITUTO FARMACOLOGICO SERONO