



LE. 1141.

Nº 361.322

SECRETARÍA DE ECONOMÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE PATENTES
MEXICO, D.F.
A. 61
K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: INVESTIGATIONS SCIENTIFIQUES PHARMACEU
TIQUES.

RESIDENCIA: Avenue Jean Moulin, CASTRES, TARN,

Francia,

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE PAN

CREOZYMINE Y SECRETINE".

Prioridad: Patente francesa n.º PV 132868 del 19.12.67, y
C.A. francés 169.925 " 15.10.68.



1 Este invento se refiere a un procedimiento de pre-
paración de un producto hormonal extraído del duodeno de
animales, por ejemplo cerdos. El producto, convenientemen-
te purificado, es especialmente interesante en aplicacio-
5 nes terapéuticas.

 La preparación de este producto hormonal se reali-
za de acuerdo con el invento por un procedimiento que pue-
de ser descompuesto en varias etapas que comprenden princi-
palmente la extracción propiamente dicha que conduce a la
10 hormona bruta, a continuación la obtención de una hormona
semi-purificada y finalmente operaciones de purificación
sucesivas.

 En la primera etapa, se ponen en contacto los duo-
denos de los animales recién extraídos con ácido clorhídri-
co diluido con objeto de extraer la hormona bruta.
15

 El ácido clorhídrico diluido en el que se disuelve
la hormona bruta tiene preferiblemente una concentración
prácticamente igual a 0,5 %.

 Después de la filtración, sobre filtros cada vez
20 más finos de acuerdo con las necesidades, el producto con-
tiene la hormona bruta con una cierta cantidad de impure-
zas protéicas y de Vasouilatine que es una sustancia de
tipo histamínico normalmente contenida en las células in-
testinales.

25 En la segunda etapa, se precipita la hormona semi-
purificada acompañada de pequeñas cantidades de sustancias
protéicas y de Vasodilatine, añadiendo a este efecto a la
solución de hormona filtrada bruta una sal neutra fuerte-
mente concentrada capaz de realizar un relargado.

30 En efecto, se sabe que el relargado es, en particu



1 lar, la precipitación de proteidos en solución acuosa, re-
sultante de la adición de ciertas sales neutras a grandes
concentraciones. Esta precipitación depende de la naturale-
za del proteido, de la sal neutra y de su concentración, del
5 valor del pH y de la temperatura.

En el caso presente, para efectuar el relargado,
se utiliza cloruro sódico puro y seco.

Después de disolver la hormona semi-purificada,
en la tercera etapa del procedimiento se realizan varios re-
10 largados para eliminar las impurezas, acompañados de una con-
centración de las soluciones sucesivas y se precipita de
forma iso-eléctrica. la Vasodilatine y las proteínas inacti-
vas alrededor de un pH 5,2, 4 y 7,5, con lo que se obtiene
una solución de hormona purificada.

15 En la cuarta etapa del procedimiento, se obtie-
ne la hormona purificada precipitándola con ácido tricloro-
acético, lavando el precipitado con disolventes orgánicos
adecuados y después secándolo a vacío en ausencia de hume-
dad.

20 Según uno de los aspectos especialmente ventajo-
sos, el invento tiene igualmente por objeto la preparación
de dos hormonas duodenatos purificadas, la Secretine y la
Pancreozymine, a partir de un producto hormonal de duodeno
obtenido parcial o totalmente mediante el procedimiento an-
25 terior.

Estas dos hormonas son especialmente interesantes
en el aspecto terapéutico y principalmente para la explora-
ción de la función pancreática externa. Pueden ser presenta-
das cada una de ellas en un frasco especial cerrado en condi-
30 ciones estériles y en atmósfera de nitrógeno y acondicionados



11

1 en un embalaje común.

5 El principio de la preparación de la Secretine y de la Pancreozymine se basa en la diferencia de solubilidad a ciertos pH de estas dos hormonas y de otras hormonas duodenatos en ciertos disolventes orgánicos.

10 De acuerdo con el invento, se trata con etanol un extracto hormonal purificado de duodeno, con lo que se obtiene una solución etanólica en la que se regula sucesivamente el pH a 5,2 aproximadamente para precipitar la Vasodilatine que se elimina y a 7,5 aproximadamente para precipitar las proteínas que se eliminan y después se trata con acetona y éter anhidro la solución etanólica resultante, cuyo pH se ha llevado a 3 aproximadamente, para precipitar un extracto que puede ser eventualmente secado hasta el estado de un polvo blanco y que contiene la Secretine y la Pancreozymine.

15 A partir de este extracto, se separa por una parte la Pancreozymine y por otra la Secretine. Para ello se trata el extracto con metanol, obteniéndose una fracción insoluble y una solución metanólica.

20 La fracción insoluble convenientemente lavada y secada da un polvo blanco que contiene la Pancreozymine.

25 La solución metanólica es purificada por ajustes sucesivos del pH a 5,2 y 7,5 aproximadamente. Los precipitados obtenidos durante cada ajuste son eliminados y la solución resultante, después de ajustar el pH a 6 aproximadamente, se trata con éter para obtener un precipitado que, una vez lavado y seco, se presenta en forma de un polvo blanco que contiene la Secretine.

30 El extracto hormonal purificado de duodeno que sir-



1 ve de material de partida en las operaciones aquí descritas
puede ser el polvo purificado obtenido mediante el trata-
miento completo del proceso en 4 etapas antes descrito.

5 También se puede partir del extracto hormonal puri-
ficado en solución obtenido después de la tercera etapa del
procedimiento. En este caso, en lugar de precipitar el ex-
tracto con una solución de ácido tricloroacético, se preci-
pita con una solución saturada de cloruro sódico y el preci-
pitado se lava con acetona y éter anhidros antes de secarlo
10 en forma de un polvo blanco que contiene todavía elementos
minerales.

15 Los dos polvos obtenidos, aplicando el procedimien-
to del invento al extracto hormonal en forma de polvo blan-
co antes citado, pueden ser sometidos a purificaciones su-
plementarias por diálisis y tratamiento con acetona y éter
anhidros, seguido de secado, lo que da unos polvos ligeros
de gran pureza que contienen Pancreozymine y Secretine, res-
pectivamente.

20 Para ilustrar el invento, damos a continuación al-
gunos ejemplos detallados de la puesta en práctica del pro-
cedimiento del invento, bajo sus diversos aspectos.

EJEMPLO 1

La extracción se realiza a partir de duodenos de
cerdos recién extraídos, lavados con agua corriente fría.

25 Se liga un extremo de un duodeno y, por la parte
abierta, se introduce una cantidad suficiente de ácido clor-
hídrico al 0,5 %, es decir alrededor de 400 a 500 cm³. Se
cierra con una pinza y se deja en contacto alrededor de
1 hora.

30 La hormona bruta se disuelve en la solución ácida



1 cuya acción es comparable en un ser vivo a la acción del
quimo ácido gástrico que, cuando pasa al duodeno, libera
dicha hormona.

5 La solución es recogida y filtrada sobre un cedazo.
Contiene la hormona bruta con una cierta cantidad de impu-
rezas proteicas y de Vasodilatine. Una segunda filtración
se efectúa sobre una gasa, y después una tercera sobre pa-
pel de filtro.

10 La solución así filtrada se introduce en una cuba
de acero inoxidable. Se añade 28 % de cloruro sódico puro
y seco, se disuelve completamente y se deja depositar du-
rante 12 a 18 horas en cámara fría, a una temperatura com-
prendida entre 2 y 4°C. La hormona precipita completamente
15 semi-purificada, es decir contiene todavía pequeñas canti-
dades de Vasodilatine y de sustancias proteicas.

 Después de este primer relargado, se filtra sobre
papel, con lo que se obtiene un precipitado que se conserva
y un filtrado salino que se desprecia. El precipitado semi-
purificado se suspende en 6 litros de una solución de áci-
do sulfúrico puro diluído al 5 %. Después de agitar lenta-
mente a la temperatura ambiente, se deja depositar y se fil-
tra en cámara fría hasta que se obtiene una solución per-
fectamente transparente, quedando las impurezas sobre el
filtro.

25 La solución de hormona así obtenida se ajusta me-
diante adición de sosa cáustica a pH 5,2-5,4, que corres-
ponde al punto iso-eléctrico de la Vasodilatine. Después
de agitar, evitando la formación de espuma, se deja en re-
poso 1 hora en cámara fría; se produce un ligero precipita-
30



1 El precipitado, recogido por centrifugación, se la-
va con acetona a razón de cuatro volúmenes de acetona por
cada volumen de hormona. Esta operación, realizada tres ve-
ces, tiene por objeto desecar la hormona y eliminar las
5 sustancias lípido-proteicas eventualmente arrastradas en
las precipitaciones, así como las trazas de ácido tricloro-
acético.

10 Se efectúa un nuevo lavado con éter etílico anhidro
a razón de tres volúmenes de éter por cada volumen de hor-
mona. Esta operación repetida tres veces elimina completa-
mente las trazas de agua.

15 Finalmente se seca la hormona a vacío en presencia
de anhídrido fosfórico y se obtiene una hormona purificada
de duodeno.

EJEMPLO 2

20 Este ejemplo se refiere a la preparación de Secre-
tine y de Pancreozymine a partir de un polvo purificado de
extractos hormonales de duodeno, obtenido mediante el tra-
tamiento completo descrito de forma detallada en el Ejem-
plo 1.

25 Se tratan 100 g de dicho extracto hormonal de duo-
deno con 500 cm³ de etanol al 90 %, enfriado a una tempera-
tura de unos +4°C. Se agita durante 5 a 6 horas en cámara
fría y se repite esta operación dos veces. Las soluciones
alcohólicas obtenidas se combinan y se filtran.

30 Se ajusta el pH de la solución alcohólica resultan-
te a 5,2 aproximadamente mediante solución alcohólica de
hidróxido sódico, lo que provoca la formación de un preci-
pitado de Vasodilatine que se deja en reposo durante 12 ho-



1 ras en cámara fría. A continuación este precipitado se elimina por centrifugación en frío.

5 Se ajusta el pH de la solución alcohólica que sobrenada a 7,5 aproximadamente, lo que provoca la formación de un precipitado de proteínas que se deja en reposo durante 12 horas en cámara fría. Después este precipitado se elimina por centrifugación en frío.

10 Se ajusta el pH de la solución que sobrenada a 3 aproximadamente mediante ácido clorhídrico y se precipitan las hormonas duodenales con cinco volúmenes de acetona/éter anhidro. Se deja en reposo durante 12 horas en cámara fría y el precipitado de hormonas se recoge por centrifugación.

15 Este precipitado se trata con tres volúmenes de acetona anhidra y después con dos volúmenes de éter anhidro. Se seca a vacío en presencia de P_2O_5 y se obtiene un polvo blanco que contiene Secretine y Pancreozymine, así como impurezas protéicas y elementos minerales tales como cloruro sódico.

20 Se procede a una purificación suplementaria y a la separación de las hormonas duodenales, operando de la forma siguiente:

25 Se tratan 10 g del polvo anterior con 500 ml de metanol enfriado. Después de haber agitado rápidamente durante 4 horas a unos $-5^{\circ}C$, se recoge por centrifugación en frío una fracción insoluble que se trata de nuevo con un volumen de metanol frío.

30 En definitiva, se dispone entonces, por una parte, de un residuo blanco que contiene la Pancreozymine y, por otra parte, de soluciones metanólicas que se combinan y



1 conservan en cámara fría y que contienen la Secretine.

El residuo blanco se lava con acetona y éter anhídrido enfriado y después se seca a vacío en presencia de P_2O_5 , obteniéndose un polvo blanco, la Pancreozymine.

5 Se toman las soluciones metanólicas conservadas en cámara fría y se ajusta su pH a 5,2 aproximadamente mediante una solución alcohólica de sosa cáustica. Se deja en reposo durante 12 horas en cámara fría, formándose un precipitado que se separa por centrifugación en frío y se desprecia.

10 Se ajusta el pH de la solución metanólica a 7,5 aproximadamente y se deja en reposo durante 12 horas en cámara fría, con lo que se forma un ligero precipitado que se separa por centrifugación en frío y se desprecia.

15 Se ajusta el pH de la solución metanólica restante a 6 aproximadamente y se precipita la Secretine añadiendo tres volúmenes de éter anhídrido, agitando y dejando en reposo después en cámara fría. El precipitado se recoge por centrifugación en frío y se deseca a vacío en presencia de P_2O_5 , formándose un polvo blanco de Secretine.

EJEMPLO 3

25 Este ejemplo ilustra la preparación de la Secretine, por una parte y de la Pancreozymine, por otra, a partir de un extracto hormonal purificado en solución, obtenido después de la tercera etapa del procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En este caso, en lugar de precipitar el extracto con una solución de ácido tricloroacético, se precipita el extracto con cloruro sódico saturado.

30 Después de haber secado al aire el precipitado obtenido se añaden siete volúmenes de acetona anhidra enfria-



1 da y se agita lentamente durante 12 horas en cámara fría.

Se separa el residuo insoluble que se forma y se trata de nuevo con siete volúmenes de acetona anhidra enfriada durante algunas horas.

5 Se separa el precipitado insoluble en acetona que se forma y se lava con tres volúmenes de éter anhidro. Se separa la solución etérea, se escurre y se deseca el producto así obtenido, a vacío, en presencia de P_2O_5 .

10 Se obtiene un polvo blanco intenso que contiene todavía elementos minerales.

Se toman 100 g de este polvo y se someten a un tratamiento como el descrito en el Ejemplo 1, obteniéndose dos polvos, uno de ellos conteniendo Pancreozymine y el otro Secretine.

15 Estos productos así obtenidos pueden ser sometidos a purificaciones suplementarias. Para cada uno de ellos puede operarse de la forma siguiente:

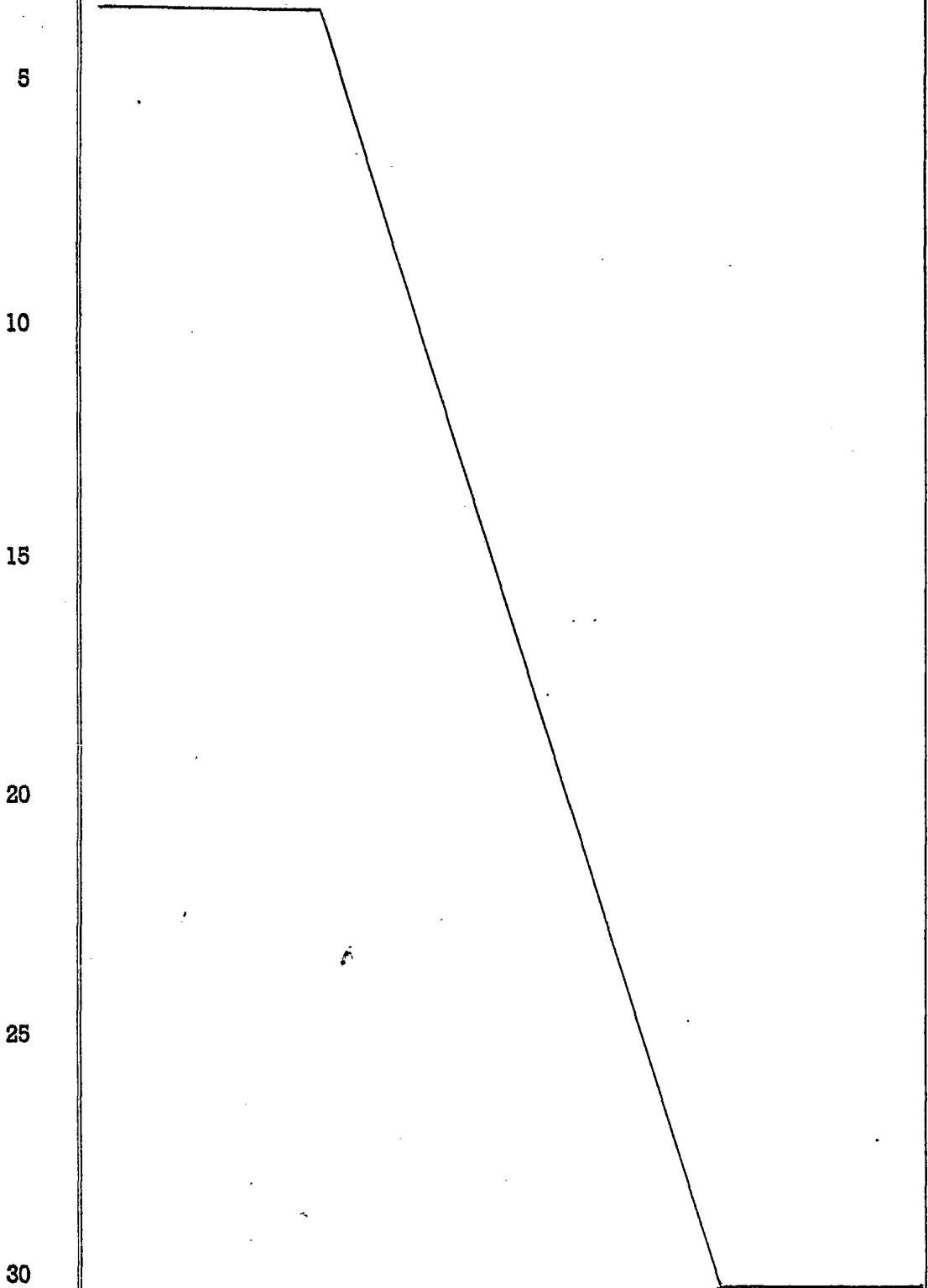
20 Se disuelve el producto en agua destilada ajustada a pH 4. A continuación se introduce la solución en la célula de un dializador provisto de membranas de Cellophane 300. Se dializa frente a agua helada en cámara fría durante 10 a 12 horas.

25 Al dializado obtenido se añaden cinco volúmenes de acetona anhidra y después tres veces el volumen inicial de éter anhidro. De esta forma se obtiene un precipitado blanco ligero que se recoge por centrifugación. Se trata tres veces con un volumen igual de éter anhidro y se deseca a vacío en presencia de P_2O_5 .

30 De esta forma se obtiene la Secretine y la Pancreozymine en forma de polvos blancos ligeros.



1 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
recaerá sobre las siguientes:





=REIVINDICACIONES=

1
5
10
15
20
25

1. Procedimiento de preparación de Pancreozymine y Secretine, caracterizado por las operaciones que consisten en poner en contacto los duodenos de animales recién extraídos con ácido clorhídrico diluido con objeto de obtener una solución de hormona bruta, efectuar un relargado sobre la solución de hormona bruta en ácido clorhídrico, con ayuda de cloruro sódico que precipite los péptidos, para obtener una solución de hormona semi-purificada, efectuar sobre esta última solución varios relargados mediante cloruro sódico que permiten la eliminación de las impurezas, la concentración de las soluciones y la precipitación y iso-eléctrica de la Vasodilatine y de las proteínas inactivas a unos valores de pH de 5,2, 4 y 7,5 aproximadamente, para obtener una solución de hormona purificada, precipitar la hormona de esta última solución mediante ácido tricloroacético, lavando el precipitado con disolventes orgánicos adecuados y secando después a vacío protegido de la humedad para obtener un extracto hormonal purificado, tratar con etanol el extracto hormonal de duodeno, lo que forma una solución etanólica cuyo pH se regula sucesivamente a 5,2 aproximadamente para precipitar la Vasodilatine que se elimina y a 7,5 aproximadamente para precipitar las proteínas que se eliminan y después tratar con acetona y éter anhidro la solución etanólica resultante cuyo pH se ha llevado a 3 aproximadamente para precipitar el extracto buscado que eventualmente puede ser desecado hasta el estado de un polvo blanco y separar la Pancreozymine y Secretine.

30

2. Procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado porque el ácido clorhídrico tiene una concentración



1 prácticamente igual a 0,5 %..

5 3. Procedimiento según la Reivindicación 1 o 2, caracterizado porque para obtener la Pancreozymine, se trata el extracto hormonal con metanol, formandose una fracción insoluble y una solución metanólica y lavar y desecar dicha fracción insoluble para obtener un polvo blanco que contiene la Pancreozymine.

10 4. Procedimiento según la Reivindicación 1 o 2, caracterizado porque para obtener la Secretine, se trata el extracto hormonal con metanol, lo que forma una fracción insoluble y una solución metanólica, purificar dicha solución metanólica por ajustes sucesivos del pH a 5,2 y a 7,5 aproximadamente para formar precipitados que se eliminan y, despues de ajustar el pH de la solución resultante a 6
15 aproximadamente, tratar a esta con éter para obtener un precipitado que, una vez lavado y secado, se presenta en forma de un polvo blanco que contiene la Secretine.

20 5. Procedimiento según la Reivindicación 3 o 4, caracterizado porque los polvos obtenidos son sometidos a purificaciones suplementarias por diálisis y tratamiento con acetona y éter anhidro, seguido de un secado que da unos polvos ligeros altamente purificados.

25 6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE PANCREOZYMINE Y SECRETINE"

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria Descriptiva que consta de catorze páginas mecanografiadas.

Madrid, 11 de Diciembre de 1968

BERNARDO UNGRIA

P.P. 