

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ES	11	NUMERO	A I
	21	453.470	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		19-11-76.	

**PATENTE DE INVENCION**

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	75 35645		21 de noviembre de 1.975		Francia.
	75 35646		21 de noviembre de 1.975		Francia.
	76 33847		10 de noviembre de 1.976		Francia.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
	PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN FACTOR HIPERGLICEMIANTE.

71	SOLICITANTE (S)
	André THOMAS.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	8, Rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, Francia,

72	INVENTOR (ES)
	el mismo solicitante.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	GOMEZ ACEBO.

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de un factor hiperglicemiante a partir de la médula ósea roja y/o de órganos fisiológicamente similares.

5. La médula ósea roja procede de los huesos planos, por ejemplo de los animales de matadero. Estos huesos convenientemente preparados son depositados en frío durante un espacio de tiempo corto, o almacenados después de la congelación a baja temperatura. Son serrados en trozos, y sus paredes óseas externas duras son eliminadas. La médula roja con su víscera ósea esponjosa es entonces cortada en fragmentos, y después trozada.

10. La pasta así preparada es sometida a las operaciones de trituración y de extracción.

El procedimiento elimina de la extracción las sustancias indeseables que pueden proceder de la víscera ósea esponjosa en la que se encuentran las células de la médula roja.

15. Estas sustancias son no solo sales, sino también cuerpos orgánicos como gelatina, oseonucoides u osealbumina y otros.

El procedimiento según la invención consiste en someter a trituración la pasta constituida por la médula ósea roja y por la víscera ósea esponjosa en presencia de agua destilada fría, en eliminar las partículas óseas por filtración, en someter al filtrado a una extracción en medio tamponado, a temperaturas comprendidas entre 60 y 100°C, y después en efectuar una nueva filtración, una concentración y purificaciones prolongadas

20. del extracto.

25.

Una forma particular de la invención consiste en efectuar la extracción no ya en el propio triturado bruto, sino en el polvo acetónico de la médula ósea roja. Para preparar el polvo acetónico, la médula roja trozada es triturada directamente

30. a gran velocidad, en dos veces al menos, en acetona pura, (por ejem-

5. plo 1 Kg de pulpa de médula roja para 5 litros de acetona); se filtra la solución acetónica; el triturado es a continuación tamizado de modo a separar las partículas óseas residuales; por último es secado. El polvo acetónico obtenido puede ser conservado a baja temperatura. Este tratamiento a la acetona elimina sustancias acetosolubles, no deseables, en cantidad importante, por ejemplo del orden del 40% y más. El polvo acetónico es entonces sometido a la extracción propiamente dicha.

10. La extracción puede efectuarse según un cierto número de variantes que forman parte de la invención.

15. En el caso en que la pasta triturada sea tratada por agua destilada fría, se opera de la siguiente manera: se añade a la pasta constituida por la médula ósea roja y la víscera ósea esponjosa que procede de los huesos planos, la mitad del agua destilada necesaria para alcanzar la dilución final elegida. La trituración se practica en este agua destilada: es muy prolongada, con un triturador a gran velocidad, por ejemplo del tipo politron; el agua destilada fría lisa las células. Se filtra el líquido de modo a retener todas las partículas óseas en suspensión (filtrado<sub>1</sub>). Se transforma entonces este filtrado en un sistema tampón.

25. Según una forma de la invención se trabaja a pH próximo de 7,5. Para ello, se añade un volumen igual al del filtrado<sub>1</sub> de un tampón de doble concentración, de modo a llevar el pH a los alrededores de 7,5; se puede utilizar una solución tampón del tipo fosfato de sodio a la concentración de 0,2M u otro tampón usual en biología. Se procede entonces a la extracción de este filtrado (1 + t) sometiendo esta solución tamponada a un calentamiento comprendido entre 60° y 100°C durante un tiempo en relación con la masa tratada, generalmente comprendido

30.

5. entre 30 minutos y 2 horas. Según otra forma de la invención se trabaja a pH comprendidos entre 4 y 6,9 y preferentemente a pH próximo de 4,5. Se puede recurrir a tampones a partir de ácidos ya sea fuertes o bien orgánicos, o a cualquier otro tampón ácido conocido en biología. Este pH ácido permite obtener medios exentos de sales, como es el caso cuando se efectúa la extracción en medio básico.

10. Para completar la extracción en un caso como en el otro (pH alcalino o pH ácido) se puede añadir a la mezcla alcohol a poca concentración, por ejemplo a 5% alcohólicos al final.

15. El filtrado<sub>(1 + t)</sub> así preparado es sometido al calentamiento entre 60 y 100°C durante un tiempo proporcional a la masa tratada, generalmente comprendido entre 30 minutos y 2 horas. Después del enfriamiento, este triturado es filtrado (filtrado<sub>2</sub>). En el filtrado queda un residuo pastoso pardo oscuro, fino, sin partículas óseas; el filtrado<sub>2</sub> es amarillo pálido, casi limpio, no contiene más que sustancias termoresistentes de la médula ósea roja, habiendo sido eliminadas las sustancias termosensibles.

20. Este filtrado<sub>2</sub> es entonces fuertemente concentrado por ejemplo con un concentrador rotativo bajo vacío o cualquier otro dispositivo conveniente. La concentración puede ser prolongada entre 5 y 20 veces. Se obtiene así el extracto bruto concentrado.

25. En este momento, el extracto bruto concentrado puede ser dializado, contra agua desmineralizada o sometida a una ultrafiltración o a una electrodiálisis; cuando la extracción tiene lugar a un pH ácido, este extracto está poco cargado en sales y estas últimas operaciones no son dispensables en la medida

30.

en que se procede a operaciones posteriores de purificación.

- Este extracto bruto concentrado sufre entonces una purificación preliminar a fin de eliminar las sustancias no activas para la aplicación buscada; para ello se puede someter el extracto a una ultrafiltración por ejemplo sobre membrana del tipo AMICON para peso molecular 10.000; se concentra y se deja precipitar a +4°C. El ultrafiltrado no contiene entonces más que sustancias termoresistentes de peso molecular inferior o igual a 10.000. Igualmente se puede practicar una purificación preliminar del extracto bruto por precipitación; para lograr esto, se puede utilizar alcohol hacia 30% alcohólicos al final, durante un tiempo corto, por ejemplo de 1 a 2 horas a 4°C, y después se centrifuga y elimina el alcohol por concentración-destilación; igualmente se puede calentar el extracto bruto concentrado al baño maria hirviente durante algunos minutos, y después centrifugar; en efecto, aunque el extracto haya sido preparado en caliente, su concentrado puede todavía precipitar a temperaturas próximas de 98-100°C. En todos los casos, los ultrafiltrados y los sobrenadantes son amarillos y presentan una fluorescencia intensa amarillo-verde en luz ultravioleta. Aunque estén relativamente poco cargados en sales, los extractores pueden ser dializados contra agua desmineralizada a +4°C. Además, el extracto bruto concentrado puede ser sometido a electrodiálisis.

- Los sobrenadantes obtenidos, parcialmente purificados, los ultrafiltrados, los dializados son cromatografiados y después fraccionados por gel-filtración; ésta es practicada según métodos conocidos sobre gel apropiado. Las curvas de % de transmisión de los fraccionamientos muestran picos que se separan. Los picos iniciales o de cabeza, 1, 2, 3, según las condiciones de masa, son poco o nada fluorescentes. Contienen en particular el

pico<sub>1</sub>, el producto activo buscado. A continuación viene un gran pico, por ejemplo el pico nº 4 que contiene sustancias intensamente fluorescentes en luz ultravioleta, pero no contiene el producto objeto de la invención. Las fracciones activas son reconcentradas y vueltas a purificar, por fraccionamientos sucesivos. Se utilizan en solución, o desecadas y puestas en polvo por medios conocidos.

5.

La forma preferida de la invención consiste en efectuar la extracción sobre polvo acetónico. Esta extracción puede ser hecha en las condiciones anteriormente indicadas ya sea por un tampón salino, o bien por una solución hidroalcohólica, que puede ser tamponada por el polvo acetónico mismo.

10.

En el caso de la extracción por tampón, se puede recurrir a diversos tampones salinos biológicos. El tampón fosfato se elige como que es de los más simples. Se puede adoptar la concentración de 0,1M a un pH de 6,8 por mezcla de fosfato disódico 0,05M y de fosfato monopotásico 0,05M. La relación puede ser, sin que ello sea limitativo, de un kilo de polvo acetónico, por ejemplo, para 5 a 10 l de tampón. La extracción se opera entre 60°C y 98°C, preferentemente a 65°C, durante 1 a varias horas, con agitación. El extracto es entonces enfriado y decantado.

15.

20.

Un método simple y eficaz, que conviene para grandes cantidades, es precipitar directamente los fosfatos, no ya precipitados por calcio liberado por los residuos óseos, sino por el cloruro de calcio, molécula o molécula, en forma de brushite. Se reajusta a un pH de 6,8 y se deja bajo agitación a +4°C, durante un tiempo suficiente, del orden de algunas horas a un día. La experiencia pone de manifiesto que la absorción por la brushite clarifica el extracto, sin que sea necesario precipitarlo desde este estadio por variación del pH o de otra manera, lo que es más

25.

30.

- o menos perjudicial. Además, la brushite no absorbe el producto activo del extracto puesto que los eluados de los precipitados de brushite, después de la absorción, no tienen actividad hiperglicemiante; además, pueden ser hipoglicemiantes, eliminando así
5. el extracto de sustancias indeseables, incluso inhibidores. El extracto es entonces centrifugado o filtrado y después fuertemente concentrado en vacío, en concentrador rotativo, por ejemplo, del orden de 20 veces aproximadamente. Este concentrado centrifugado corresponde al extracto bruto: todavía es rico en sales
10. y en diversas sustancias proteolipídicas y glucídicas. Puede ser entonces el objeto de una semi-purificación. Esta puede realizarse por precipitación, en frío, de diversas maneras, por etanol, metanol, o por una sal como acetato de cinc; el extracto es precipitado abundantemente en efecto por concentraciones muy débiles
15. de acetato de cinc, por ejemplo iguales o inferiores a 0,004M; la débil dosis de cinc añadida no es en modo alguno tóxica en la preparación final que procede del sobrenadante y no del precipitado; por el contrario, refuerza las propiedades hiperglicemiantes. La precipitación puede también obtenerse por otros cuerpos
20. o mezclas, mezclas tales como metilal-metanol, lo que produce una delipidación y una desaladura importante. El extracto es entonces centrifugado y el sobrenadante tomado; éste es eventualmente secado; en ese caso, puede ser disuelto de nuevo en etanol a diversas concentraciones, lo que contribuye a aumentar la desaladura.
25. ra.

Una variante del procedimiento es practicar la semi-purificación después de haber ultrafiltrado el extracto. Las operaciones de precipitación son entonces las mismas que las que acaban de ser indicadas, pero impiden sobre un ultrafiltrado ya

30. parcialmente purificado.

5. Para una purificación pulsada, se puede recurrir a la dialisis, o a la electrodialisis, o a la ultrafiltración, o a la osmosis inversa, y por último al fraccionamiento por cromatografía, por gel-filtración, según los métodos conocidos, y como ha sido anteriormente indicado. El extracto activo es entonces llevado en estado seco por liofilización o desecación en vacío.

10. Un segundo tipo de extracción, y que forma igualmente objeto de la invención, es la utilización, a partir del polvo acetónico de médula ósea roja, de soluciones hidroalcohólicas de 5° alcohólicas y más, por ejemplo al título de 80° alcohólicas, produciendo entonces el polvo acetónico proteolípido, por su parte, y en los límites de pH indicado, un efecto tampón. Este pH puede ajustarse por lo demás si ello es necesario hacia pH 6,8. La extracción hidroalcohólica por ejemplo en las

15. proporciones de 1 Kg de polvo para 5 a 10 litros de solución hidroalcohólica, es continuada en las mismas condiciones que la de la extracción por tampón fosfato expuesto más arriba; sin embargo, en ese caso, la concentración debe permitir, por destilación, la eliminación del alcohol. La fase acuosa residual es

20. entonces tratada como se ha indicado para la extracción por tampón salino. Por el contrario, en el caso de la extracción hidroalcohólica, como en el de otros tampones, por ejemplo acetato, y puesto que no se parte de un tampón que contiene fosfato, la clarificación se realiza añadiendo la brushita toda preparada, fresca

25. y lavada (precipitado de fosfato de calcio, ajustado a un pH de 6,8 y centrifugado). Cualquier otro adsorbente eficaz que produzca un efecto similar al de la brushita, en el caso de la extracción inicial por la solución hidroalcohólica o por otros tampones diferentes del fosfato, puede utilizarse naturalmente.

30.

5. Sin embargo, un punto importante y que forma parte de la invención es que, si el producto activo no es adsorbido en un adsorbente mineral como la brushite, puede serlo muy eficazmente sobre precipitados orgánicos lipoproteicos que proceden del propio extracto. Esto corresponde a un tipo de extracción por crioprecipitación.

10. El extracto semi-purificado, es conservado preferentemente en tubos plásticos transparentes y deformables, por ejemplo a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Se produce una crioprecipitación en forma de finos grumos. Ahora bien, los que se reúnen en una pequeña parte superficial, y en la mayor parte en el fondo de los tubos, adsorben electivamente el compuesto activo y lo concentran.

15. Durante la descongelación, a la temperatura ambiente, estos grumos activos corresponden a las cabezas de descongelación, dicho de otro modo a la fracción de menor punto de congelación. Estas cabezas que están muy concentradas, son recogidas desde su descongelación, por una parte en la superficie, y, por otra, sobre todo en la porción inferior de los tubos, cortando estos por ejemplo. El resto de los crioprecipitados, que  
20. se descongelarán más tarde y que son cada vez más acuosos, no adsorbe el producto activo a concentración suficiente. Estas cabezas de descongelación son centrifugadas y el producto activo que es hidrosoluble es separado por simple elución de los precipitados lipoproteicos adsorbentes y que por su parte son inactivos.

25. Otras posibilidades de adsorción por estructuras orgánicas pueden utilizarse. Tan es así que el tratamiento del extracto por éter etílico da un precipitado de intercara que adsorbe el compuesto activo; o incluso que la precipitación del extracto por acetato de cinc en presencia de calcio pueda conducir a la producción de coarcevatos muy regulares que adsorben tam-  
30.

bien electivamente y concentran el producto activo.

Estas diversas variantes de extracción se aplican a todo órgano susceptible de liberar, como la médula ósea roja, un compuesto hiperglicemiante.

5. Los extractos y productos obtenidos según la invención son utilizados como agentes terapéuticos administrables por vía intravenosa o parenteral.

10. Tienen propiedades fisiológicas que les caracterizan. Contienen un factor que provoca, por inyección intrasanguínea, una elevación extraordinariamente fuerte, durante algunas horas, del grado de la glucosa en la sangre que circula y correlativamente una expulsión urinaria de esta glucosa, que se acumula así en la vejiga.

15. Las cifras, por ejemplo en el conejo, pueden corresponder a una glicemia progresiva que alcanza en 5 horas 10,5 gramos por litro de suero sanguíneo, o que sobrepasa esta cifra. Además, la expulsión urinaria de la glucosa lleva la glicosuria hasta grados experimentales de más de 50 g por litro de urina; en algunos casos, esta glicosuria puede ascender hasta

20. los 100 g por litro.

Ahora bien el estudio bioquímico minucioso demuestra que, contrariamente a las hormonas hiperglicemiantes conocidas, esta glucosa liberada tan maxivamente, procede no solo de una degradación del glicógeno o glicogenolisis en algunos órganos como el hígado principalmente, pero es de orden general.

25. Por ejemplo, contrariamente al glucagon que no tiene acción sobre la glicogenolisis en los músculos, el factor descubierto reduce el grado de glicógeno en los músculos y en los principales órganos, hasta anularlo completamente. Esta glicogenolisis general

30. y esta vibración en la sangre de glucosa a partir de otras fuentes

todavía, provoca progresivamente la expulsión glicosúrica considerable de la que se ha hablado.

5. El factor hiperglicemiante, separado por el proceso según la invención, no altera las funciones sanguíneas y cardíacas, como lo demuestran las medidas y los electrocardiogramas. Por el contrario, a dosis fisiológica, actúa sobre estas funciones de forma benéfica. Los órganos no son alterados y el grado de la glucosa sanguínea vuelve ulteriormente a la normalidad. Este factor es termostable y de naturaleza protéica; da una viva reacción con el p. dimetilaminobenzaldehído según Ehrlich, 10. indicadores de las glicoproteínas. Este ensayo es confirmado por la reacción específica de Elson-Morgan.

15. Los principios de preparación descritos pueden ser aplicados, sin salir del marco de la invención a todo órgano fisiológicamente equivalente a la médula ósea roja.

Los ejemplos que siguen son dados a título no limitativo.

EJEMPLO 1. Preparación del extracto de médula ósea roja -

Tratamiento con agua destilada fría.

20. Ahillos óseos pelvianos de pelvis de ternero son tomados inmediatamente después de la matanza; son desprovistos de sus músculos y puestos en frío, o mejor congelados. Los huesos son serrados en trozos y sus paredes óseas duras externas toscamente eliminadas. La médula ósea roja es suministrada en pequeños 25. fragmentos y después tratada ya sea inmediatamente o bien después del almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante varios meses. Estos fragmentos son trozados y la pasta obtenida puesta en agua destilada fría. Si la proporción final es de 1 Kg de pasta de médula roja para 10 litros, se puede añadir, según el procedimiento elegido, 30. litros de agua destilada, es decir la mitad del volumen final ele-

gido, o bien recurrir a la variante de añadir de corrida la totalidad del volumen de agua, es decir 10 litros.

5. La suspensión es triturada fuertemente en el triturador a gran velocidad por ejemplo del tipo politron, durante un tiempo suficiente, es decir 4 veces 5 minutos. Este triturado se filtra en una espesa capa de gasa, o sobre cualquier otro tamiz capaz de retener todas las partículas óseas de la víscera ósea de la médula roja y que están en suspensión en el triturado.

a) Extracción en medio alcalino

10. Se duplica entonces el volumen del filtrado obtenido por tampón fosfato 0,2 M a un pH de 7,5 que contiene alcohol a 10% alcoholicos. El conjunto corresponde por tanto a 1 Kg de triturado en 10 litros de tampón 0,1M de pH 7,5 al título alcoholico de 5%. Se calienta esta preparación al baño maria, a 15. 60° durante 30 minutos. Se deja enfriar, y después se filtra. El filtrado que está casi limpio y de color amarillo palido es concentrado 10 veces aproximadamente en el concentrador rotativo en vacío. Es ultrafiltrado sobre membrana PM 10.000, recircitado, fraccionado por gel-filtración en Séphadex G 50 Fine. Las fracciones que corresponden a los picos de cabeza, principalmente 20. el pico 1, son recogidas y su proporción en proteínas, dosificada. Su purificación pulsada es continuada por fraccionamientos sucesivos. Se utilizan ya sea en solución ajustada a una proporción en proteína conocida, o bien puestas en polvo. Es soluble en agua 25. destilada, y clara en solución concentrada, hacia un pH de 6.

b) Extracción en medio ácido

30. Se duplica el volumen del filtrado obtenido por un tampón acetato 0,2M a un pH de 4,3, que puede o no contener alcohol a 10% alcoholicos. El conjunto corresponde por tanto a un kilo de triturado en 10 litros aproximadamente de tampón 0,1M

- de pH 4,3, que puede o no comprender alcohol a 5° alcoholicos.
- Si se ha utilizado de corrida la cantidad total de agua destilada para efectuar la suspensión y la trituración de la médula roja, después de la trituración y eliminación de los fragmentos óseos,
5. se añaden los elementos del tampón ácido, es decir el ácido acético hasta la estabilización al pH de 4,3.

- La preparación es entonces calentada al baño maria, a 60°C durante 30 minutos, o al baño maria hirviendo durante 30 minutos. Se deja enfriar y después se filtra. El filtrado es
10. claro y amarillo palido. Se concentra en un concentrador rotativo en vacío. Si la concentración es suficientemente pulsada, de 20 veces o más, el concentrado comienza a precipitar en caliente; se deja entonces esta precipitación que se concluya a +4°C y se filtra, o se centrifuga. La precipitación de las sustancias no
15. deseables para el fin perseguido es completada por una precipitación por alcohol, añadiendo alcohol a 70°, volúmen a volúmen, lo que lleva el título alcoholico a 35° aproximadamente, durante 1 o 2 horas, a +4°C, y se centrifuga. Se puede igualmente efectuar un corto calentamiento de 5 minutos del filtrado, al baño maria
20. hirviendo, y centrifugar después del enfriamiento.

- Estas preparaciones son sometidas al fraccionamiento por gel-filtración en Séphadex G 50 Fine, equilibrado por tampón acetato 0,02 M de pH 4,3. Solo los picos 1, 2, 3 de cabeza son tomados y después concentrados 5 veces, y su proporción en
25. proteína dosificada; la purificación de este extracto es continuada por fraccionamientos sucesivos. Se lleva al estado seco y se reduce en polvo. Este polvo es soluble en agua destilada; por ligera acidificación, la solución, incluso concentrada, es perfectamente clara e incolora. Puede ser esterilizada de nuevo. El
30. extracto puede también ser tratado por otros métodos de concen-

tracción ultrafiltración, electrodiálisis.

EJEMPLO 2.- Extracción del compuesto hiperglicemiante a partir de un tampón salino.

5. La médula ósea roja separada de las paredes óseas duras, de los huesos planos de animales jóvenes de matadero, como se ha indicado en el ejemplo 1, es congelada a baja temperatura. Es trozada y después triturada muy finamente 2 a 3 veces, con un triturador de gran velocidad, en acetona pura a razón de un kilo de pulpa de médula roja por 5 litros de acetona. El triturado acetónico es decantado, tamizado en rejilla de modo a eliminar las partículas óseas residuales; se recoge sobre filtro Buchner. 10. La pasta acetónica que sirve para la extracción, puede ser conservada tal cual, a baja temperatura. Esta extracción acetónica previa elimina una cantidad importante de sustancias acetosolubles, del orden del 40% y más. 15.

La extracción de la pasta es hecha por un tampón salino en caliente. El tampón fosfato de sodio, a la concentración de 0,1 M de pH 6,8 se elige preferentemente, en la proporción de 1 kg de polvo acetónico por 5 litros de tampón. La extracción se opera a 65°C durante 1 hora, con agitación constante. El extracto refrigerado y decantado, es precipitado por cloruro de calcio, molécula o molécula, con respecto al fosfato del tampón. Después del reajuste a un pH de 6,8, la precipitación-adsorción por fosfato de calcio así formado (brushite) en el extracto mismo, es 20. continuada a +4°C durante 10 horas. La brushite no adsorbe el compuesto hiperglicemiante pero separa por adsorción fracciones inactivas e incluso inhibidoras. El extracto es entonces centrifugado, o filtrado, y después concentrado 20 veces en vacío. 25.

El extracto bruto así obtenido es entonces sometido a una semi-purificación por precipitación a +4°C y según 30.

5. el caso, durante algunas horas a 1 día, por etanol o metanol, o muy pequeñas cantidades de acetato de cinc cuya concentración final es a lo sumo 0,004 M. La centrifugación permite entonces separar un sobrenadante que contiene el producto activo. Este es secado y extraído de nuevo, o según el caso, ultrafiltrado y utilizado tal cual o precipitado.

10. La purificación pulsada del extracto se realiza -por los diversos medios conocidos de diálisis y de fraccionamiento bioquímico. El extracto es llevado al estado seco por liofilización o desecación en vacío.

EJEMPLO 3.- Extracción del compuesto hiperglicemiante por una solución hidroalcohólica.

15. El polvo acetónico de médula ósea roja es extraído por alcohol a 80% alcohólicos, a razón de 1 kg de polvo por 5 l, pudiendo ser ajustado el pH hacia 6,8. La extracción es continuada a 65°C durante una hora, bajo agitación constante. El extracto enfriado es decantado y filtrado y después concentrado 20 veces en vacío, de modo a eliminar el alcohol por destilación. A la fase acuosa restante se añade un precipitado pastoso de brus-

20. hite recientemente preparada y lavada, siendo ajustado el pH a 6,8. La adsorción es continuada a +4°C durante 10 horas, bajo agitación constante. El extracto es entonces centrifugado y después semi-purificado por precipitación o purificado por fraccionamiento como se ha indicado en el ejemplo 1.

25. EJEMPLO 4.- Separación del compuesto hiperglicemiante por crioprecipitación.

30. El extracto bruto o semi-purificado obtenido ya sea según el ejemplo 1, o según el ejemplo 2, pero preferentemente después de la extracción por tampón salino, eventualmente después de la ultrafiltración, es puesto a congelar a -25°C en tubos plás-

ticos, deformables.

5. Se produce una crioprecipitación en forma de finos grumos. Estos grumos que son recogidos en la superficie y principalmente en el fondo de los tubos, corresponden a las fracciones de menor punto de congelación; son las más concentradas. Adsorben electivamente el compuesto hiperglicemiante. Se descongelan las primeras, a la temperatura ambiente, y constituyen cabezas de descongelación que son tomadas inmediatamente después de haber sido descongeladas; son entonces centrifugadas. El residuo de
10. centrifugación es eluado en solución acuosa y utilizado tal cual o purificado según los ejemplos 1 y 2. El residuo proteolipídico que queda es inactivo.

EJEMPLO 5.-Propiedades farmacológicas.

15. Conejos machos o hembras, normales, de 4 kg aproximadamente, son inyectados por vía intrasanguínea con los nuevos extractos. El grado de su glicemia y de su glicosuria es dosificado durante las horas siguientes. Antes del tratamiento estos conejos tienen grados de glicemia que varían de 1g a 1,20 g  $\frac{0}{100}$ . Asimismo, los grados correlativos del glicógeno y de la glucosa son
20. dosificados en sus principales vísceras y en sus músculos. Los resultados muestran que el compuesto hiperglicemiante de la médula ósea roja provoca rápidamente una glicogenolisis esencialmente en el hígado y los órganos, pero también en los músculos, contrariamente a la acción del glucagón. La glucosa que así resulta alcanza grados muy elevados a la vez en la sangre y en la orina. La
25. glicemia y la glicosuria aumentan de forma correlativa, llegando a una expulsión glicosúrica extremadamente importante incluso entre los conejos ya hiperglicémicos y, lo que es de hacer notar, en el conejo diabético, a una glicosuria intensa sin aumento im-
30. portante de la glicemia. El compuesto hiperglicemiante de la mé-

dula ósea roja entra en el ciclo fisio-patológico muy complejo de la regulación hormonal de los glucidos.

Las cifras siguientes son dadas en ejemplo.

5. Después de la extracción según el ejemplo 2, la dosis inyectada en el conejo, expresada en proteínas, es de 210  $\gamma$ /kg, que lleva la glicemia de 1,82 g  $^{\circ}$ /oo a 4,16 g  $^{\circ}$ /oo en 30 minutos, y la glicosuria a 71,7g  $^{\circ}$ /oo en 5 horas. Esta dosis puede incluso ser reducida a 140  $\gamma$ /kg y llevar la glicemia a 5,9 g  $^{\circ}$ /oo y la glicosuria a 54,8g  $^{\circ}$ /oo en 5 horas. Para dosis más fuertes, la glicemia puede alcanzar el grado muy elevado de 10,3 g  $^{\circ}$ /oo en 5 horas, y la glicosuria 48,1g  $^{\circ}$ /oo. A veces la glicosuria alcanza la cifra de 86,9g  $^{\circ}$ /oo, e incluso, en el caso del método de crioprecipitación, según el ejemplo 3 y después de la extracción por tampón fosforo, de 99,5 g  $^{\circ}$ /oo.

15. Después de la precipitación por acetato de cinc, el aumento de grado de glicemia puede ser extremadamente rapido y alcanzar 6,15g  $^{\circ}$ /oo en 1 hora unicamente, mientras que en el mismo momento el grado de glucosa en la orina es ya de 33,8g  $^{\circ}$ /oo.

20. Asimismo, después de la extracción, según el ejemplo 3, la dosis inyectada puede ser inferior a 100  $\gamma$ /kg y provocar en 1 hora una glicemia de 6,73 g  $^{\circ}$ /oo y una glicosuria de 5,22 g  $^{\circ}$ /oo. El liofilizado y el dializado dan también ejemplos significativos: tan es así que a la dosis de 450  $\gamma$  de proteínas/kg, el dializado produce una glicosuria de 62,4g  $^{\circ}$ /oo en 5 horas.

25. En el conejo ya hiperglicémico, el extracto según el ejemplo 1 provoca unicamente un aumento bastante pequeño de la glicemia, 3,38 g  $^{\circ}$ /oo de partida hasta un máximo de 4,37 g  $^{\circ}$ /oo en 1 hora 30 minutos, pero a continuación la curva decrece gradualmente y cae a 3,42 g  $^{\circ}$ /oo en 5 horas; por el contrario, en ese estado, la glicemia alcanza 70  $^{\circ}$ /oo.

30.

Por último, en el comienzo diabético, después de la extracción del tipo del ejemplo 2, la glicemia parte del grado elevado de 7 g °/oo, alcanza unicamente un máximo de 9,66 g °/oo en 30 minutos y después decrece hasta 5,68g °/oo en 5 horas; ahora bien, en ese momento, la glicosuria es de 52, 8g °/oo, que pone de manifiesto que el exceso de glucosa es expulsado en la orina.

5. El compuesto hiperglicemiante tiene, además, otras propiedades farmacológicas: actua sobre el catabolismo de los lípidos, disminuye el grado de colesterol de 1,31g °/oo a 1,06 g °/oo en el suero, unicamente en 5 horas y después de una sola inyección. Puede actuar sobre el desarrollo celular según los trabajos en curso. No tiene acción nociva sobre el funcionamiento del corazón como lo demuestran los electrocardiogramas.

10. Descrita suficientemente la naturaleza 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 cuanto no alteren su principio fundamental.

15.

REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento de preparación de un factor hiperglicemiante que provoca una glicogenolisis general y una repulsa glicosúrica, caracterizado porque se extrae de médula ósea roja que procede los huesos planos de los que han sido eliminadas las paredes duras óseas.
10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la extracción propiamente dicha es precedida de un tratamiento con agua fría de la pasta obtenida por trituración de la médula y de su viscera, con vistas a la obtención de un filtrado.
15. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el mencionado filtrado es sometido a una extracción en medio tamponado a temperaturas comprendidas entre 60 y 100°C, a una nueva filtración, una concentración y purificaciones tales como dialisis, ultrafiltración, electrodiálisis.
20. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la extracción es efectuada a un pH alcalino próximo de 7,5 por una solución tampón, fosfato de sodio preferentemente.
25. 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la extracción es efectuada a un pH ácido comprendido entre 4 y 6,9 preferentemente 4,5 por una solución tampón, acetato, preferentemente.
30. 6.- Procedimiento según la reivindicación 4, ó 5, caracterizado porque se añade a la mezcla alcohol a débil concentración.
- 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la extracción es efectuada sobre polvo acetónico obtenido por trituración de la médula roja desmenuzada, a gran

velocidad, en dos veces al menos, en acetona pura, filtración de la solución acetónica, y obtención del polvo acetónico sobre el filtro.

5. 8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado porque la extracción del polvo acetónico es efectuada según las condiciones descritas antes.

10. 9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado porque la extracción del polvo acetónico es efectuada por un tampón fosfato 0,1 M de pH 6,8, preferentemente mezcla de fosfato monopotásico.

15. 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque con vistas a precipitar los fosfatos en forma de fosfato de calcio-brushite, se añade cloruro de calcio, molécula a molécula, siendo tratado el filtrado como anteriormente.

20. 11.- Procedimiento según las reivindicaciones 7, 8, 9 y 10, caracterizado porque el extracto obtenido es purificado, por precipitación, por etanol, metanol, acetato de cinc, mezclas metilal-metanol, con vistas a la obtención de un sobrenadante rico en el compuesto buscado.

25. 12.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado porque la extracción del polvo acetónico es efectuada por una solución hidroalcohólica de 5 a 80% alcohólicos, siendo utilizado el polvo acetónico como tampón y estando definido el resto de las operaciones como anteriormente.

30. 13.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el extracto obtenido como anteriormente, es purificado por crionrecipitación, siendo concentrado el producto activo en las cabezas de descongelación.

14.- Procedimiento de preparación de un factor hiperglicemiante, tal y como queda sustancialmente descrito en la

presente Memoria

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

Madrid, 28 FEB. 1977

André THOMAS,

GOMEZ ACEBO Y MOBER

s. p. Firmado L. Costa Fernández



5.