



19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	461179		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			29 JUL 1977		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		3468/76	30 Julio 1976		Dinamarca

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			<i>A01K</i>		- - -

54 TITULO DE LA INVENCION

"Método de obtención de hormonas proteínicas"

71	SOLICITANTE (S)
	NORDISK INSULINLABORATORIUM
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	Ved Stadion 2, DK-2820 Gentofte, Dinamarca
72	INVENTOR (ES)
	Erik Pedersen
73	TITULAR (ES)
74	REPRESENTANTE
	M. Ourell Sufiel

76.580 Span. 68-/sh
EX-DK

BAD ORIGINAL

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de NORDISK INSULINLABORATORIUM,
de nacionalidad danesa, domiciliada en Ved Stadion 2,
DK-2820 Gentofte, Dinamarca, por "Método de obtención de hor-
monas proteínicas", con prioridad de la solicitud danesa nº
3468/76 de fecha 30 Julio 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. La presente invención se refiere a un método de ais-
lamiento y de recuperación (es decir, obtención) de hormonas
proteínicas, derivadas de tejidos pituitarios, por medio del
cual un extracto acuoso que contiene las hormonas proteínicas
se somete a precipitación fraccionada con un agente precipi-
tante. - - - - -

10. Es particularmente el objetivo de la invención ais-
lar la hormona pura del crecimiento a partir de extractos de
tejidos pituitarios. - - - - -

Es otro objetivo de la invención proporcionar un mé-
todo por medio del cual puede aislarse selectivamente la hor-

mona del crecimiento a partir de otras hormonas proteínicas y de impurezas, por lo cual se obtiene en un estado particularmente puro y con alto rendimiento. - - - - -

5. Finalmente, es el objetivo de la invención proporcionar un procedimiento simplificado por medio del cual se aislan y recuperan la hormona del crecimiento y otras hormonas proteínicas a partir de tejidos pituitarios. - - - - -

10. Es conocido aislar hormona del crecimiento por medio de la extracción de tejidos pituitarios y de la precipitación de la hormona del crecimiento a partir del extracto mediante un agente precipitante. - - - - -

Son ejemplos de publicaciones que describen procesos para la recuperación de hormona humana del crecimiento:-

- 1) Biochemica et Biophysica Acta 1963, páginas 525-531 y - -
- 15. 2) Acta Endocrinologica 1971, 66, páginas 478-490. - - - - -

20. Un método de separar mezclas de hormonas pituitarias se menciona en la patente suiza 230.807. Las patentes US 3.415.804, 3.652.530, 3.763.135 y 3.808.109 presentan métodos de fraccionación de proteínas utilizando polietilenglicol como agente precipitante. Sin embargo, era imposible deducir de las mismas que el polietilenglicol es adecuado para la fraccionación de hormonas pituitarias o para la precipitación selectiva de la hormona del crecimiento bajo condiciones controladas.

ladas. La aplicación de ciertos copolímeros en bloque se revela en la solicitud de patente danesa 3321/74. - - - - -

5. En los procedimientos de la técnica anterior para la recuperación de hormona humana del crecimiento se obtienen los más altos rendimientos con glándulas pituitarias congeladas como material de partida y utilizando suaves condiciones de extracción y de precipitación. Es típico proceder como sigue: - - - - -

10. 1) se extraen glándulas pituitarias congeladas (o "ultracongeladas") con un tampón neutro o básico, - - - - -

2) el extracto se precipita con un agente precipitante y/o por medio del ajuste del valor de pH a 4,8, - - - - -

3) el precipitado se extrae con un tampón neutro o ácido, -

15. 4) el extracto se purifica adicionalmente por precipitaciones repetidas y/o cromatografía en columna, por ejemplo filtración con gel sobre Sephadex G100. - - - - -

20. Como agente precipitante en la anterior etapa 2 se utilizaba anteriormente, en parte, sulfato amónico que, sin embargo, da un producto final impuro y, en parte, acetona que desnaturaliza las proteínas en un grado tal que resultan difícilmente solubles en las extracciones subsiguientes, originando un mal rendimiento. - - - - -

La calidad de la hormona del crecimiento se examina utilizando entre otros los siguientes métodos: - - - - -

Actividad biológica (ensayo de la tibia), - - - - -

5. Actividad inmunológica (inmunodifusión radial o inmunoensayo de radio), - - - - -

Filtración con gel (examen por lo que se refiere a polímeros),

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (examen por lo que se refiere a proteínas extrañas). - - - - -

10. Una hormona pura del crecimiento se caracteriza por que 1) tiene una actividad de más de 500 unidades internacionales por cada mg de proteína, 2) más del 90% se halla disponible en forma monomérica, 3) por PAGE de 100 μ pueden hallarse sólo, después de la coloración de la proteína, bandas correspondientes a la hormona del crecimiento o a la hormona del crecimiento y a sus formas 1-2 desamido.

15.

20. El método según la invención se caracteriza porque el extracto acuoso procedente de tejidos pituitarios se precipita con una o más porciones de polietilenglicol a un valor de pH de 4 a 6, ajustándose la cantidad de polietilenglicol de modo que la hormona o las hormonas proteínicas secadas se aislen en fracciones, después de lo cual las fracciones se procesan de manera conocida en sí para aislar las hormonas proteínicas en estado purificado. - - - - -

5. Por realizar el precipitado de esta forma se obtiene un producto puro con alto rendimiento. Por ejemplo, el polietilenglicol (PEG) actúa más selectivamente como agente precipitante que el sulfato amónico. Por ello las hormonas pituitarias, especialmente la hormona del crecimiento, se obtienen en estado más puro. Además, se evita la denaturalización provocada por la acetona, lo que origina un rendimiento muy alto. - - - - -

10. El método según la invención no está limitado al uso de extractos pituitarios primarios sino que es también aplicable al aislamiento de hormonas pépticas y proteínicas a partir de, por ejemplo, medios de cultivo procedentes de cultivos de tejidos pituitarios. - - - - -

15. Según la invención se prefiere realizar la precipitación con polietilenglicol a un valor de pH de 4,5 a 5,0, que es el valor óptimo. Se obtienen resultados particularmente buenos a un valor de pH de unos 4,8. - - - - -

20. El polietilenglicol empleado como agente precipitante tiene preferentemente, según la invención, un peso molecular de 3000 a 6000. Sin embargo, el método puede también realizarse con polietilenglicol de peso molecular superior a 6000 o de peso molecular inferior a 3000. - - - - -

Para separar y aislar las hormonas pituitarias más importantes el método según la invención puede realizarse con

venientemente por medio del aumento de la concentración escogida de polietilenglicol en el extracto, pasando gradualmente de 0 a 30% (P/V). Por medio de la filtración del precipitado formado después de cada mezcla se logra una separación eficaz de las hormonas pituitarias individuales. Las fracciones pueden entonces procesarse por separado para obtener las hormonas puras. - - - - -

Según una realización preferida de la invención por medio de la cual se recupera la hormona del crecimiento es conveniente aislar las fracciones precipitadas del extracto cuando el extracto contiene de 10 a 14% (P/V) de polietilenglicol. Esto produce un alto rendimiento de hormona precipitada del crecimiento que puede purificarse de manera conocida en sí. - - - - -

Como material de partida puede utilizarse en el método descrito cualquier extracto conocido de tejido pituitario o de cultivos de tejido que contengan hormonas pituitarias. El extracto puede prepararse de manera conocida en sí, tal como por desmenuzado, cortado u otra forma de desintegración de las glándulas pituitarias, y extracción con disoluciones tampón acuosas. Un agente de extracción adecuado es un tampón fosfato acuoso que tenga un valor de pH de 8-9, tal como 8,7. Pueden también utilizarse otros tampones a un valor de pH superior o inferior. - - - - -

Es ventajoso añadir PEG al extracto filtrado, a un

9. valor de pH de 8-9, después de lo cual el valor de pH se reduce a de 4,5 a 5,0, por ejemplo 4,8, por medio de la adición de un ácido, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido acético. También es posible, sin embargo, ajustar primero el valor de pH a de 4,5 a 5,0 y luego añadir PEG. Si se desea, el ajuste del pH puede efectuarse al mismo tiempo que la adición de PEG* - - - - -

10. La cantidad de PEG depende de la hormona pituitaria que se desea precipitar y se efectúa una mezcla escalonada cuando se desea separar el número máximo de hormonas pituitarias. Por ejemplo, el proceso puede iniciarse por medio de una adición de PEG de unos 10% y la mezcla se filtra, después de lo cual se ajusta el valor de pH a 4,8, por ejemplo. Después de la filtración, si se desea, se mezcla más PEG en 15. una o más adiciones para obtener unos 14% de PEG. Las fracciones resultantes contienen hormona del crecimiento con alto rendimiento. Con nuevas adiciones precipitan otras fracciones, que contienen, por ejemplo, las hormonas pituitarias FSH y LH. - - - - -

20. Las fracciones precipitadas se procesan de manera conocida en sí. El precipitado puede, por ejemplo, aislarse por centrifugación, después de redisolverlo en un tampón, tal como a pH 6,5-8, por ejemplo pH = 7,0. Después se efectúa precipitación con disolución saturada de sulfato amónico. El precipitado resultante se separa por centrifugación y se redissuelve en un tampón que se somete a cromatografía u una co- 25.

luna que contiene un tamiz molecular o una resina de intercambio iónico, ácida o básica. Por medio de cromatografía se isolan las fracciones que contienen las hormonas pituitarias puras, tales como la hormona del crecimiento. - - - -

5. El método según la invención se ilustrará con mayor detalle a continuación por medio de algunos ejemplos. - -

EJEMPLO 1

10. Se homogenizan 24 glándulas pituitarias humanas con geladas al tiempo que se añaden 100 ml de un tampón (I) compuesto como sigue: 1,8% de bifosfato disódico en agua, mezclada con hidróxido sódico 1N a pH = 8,7. La mezcla se centrifuga. A 90 ml del líquido sobrenadante se le añaden 24 ml de una disolución acuosa de 50 g de polietilenglicol 6000 en disolución de 100 ml. Después de agitar durante 30 minutos la
15. mezcla se centrifuga y se ajusta el valor del pH del sobrenadante a 4,8 por medio de 1N de ácido clorhídrico. Después de centrifugar el precipitado se extrae con 60 ml de un tampón (II) compuesto como sigue: 1,4% de bifosfato disódico, 4,9% de bifosfato monosódico, mezclados con hidróxido sódico 1N a
20. pH = 7,0. Después de agitar durante 1 hora la mezcla se centrifuga y el sobrenadante se mezcla con 60 ml de disolución saturada de sulfato amónico. La mezcla se centrifuga de nuevo y el precipitado se disuelve en 25 ml de una disolución (III) compuesta como sigue: 2% de ácido aminoacético y 0,25%
25. de bicarbonato sódico. Esta disolución se aplica a una colum

- na de una longitud de 79 cm y de un diámetro de 2,5 cm, que contiene Sephadex G100, equilibrada con disolución III. La columna se eluye con disolución III y se recogen las fracciones correspondientes al volumen de elución de 260-320 ml.
5. Las fracciones recogidas contienen 260 unidades de hormona humana del crecimiento, con una actividad específica de 2,2 unidades por cada mg de proteína. La electroforesis en gel de poliacrilamida de 100 μ de proteína presenta sólo tres bandas, correspondientes a la hormona del crecimiento y a las formas desamada. - - - - -
- 10.

EJEMPLO 2

- Se extraen 250 glándulas pituitarias humanas congeladas como se ha descrito en el ejemplo 1 con 1500 ml de tampón I. Al sobrenadante se le añaden 460 ml de una disolución compuesta por 230 g de polietilenglicol 3000 y 270 ml de agua. Después de agitar durante 20 minutos y de centrifugar, se ajusta el valor de pH del sobrenadante a 4,9 con 1N de ácido clorhídrico. Después de agitar durante 20 minutos y de centrifugar, el precipitado se extrae como se ha indicado en el ejemplo 1 con 1000 ml de tampón II. Después de agitar durante la noche y de centrifugar se añaden al sobrenadante 1000 ml de disolución saturada de sulfato amónico. La mezcla se agita de nuevo y el precipitado se disuelve en 300 ml de una disolución de 126 g de urea en 207 ml de tampón III (véase el ejemplo 1). La disolución se aplica a una columna de una longitud de 100 cm y de un diámetro de 11,4 mm que contiene Sephadex
- 15.
- 20.
- 25.

9. Glee, equilibrada con tampón III. La columna se eluye con tampón III. Se recogen fracciones correspondientes al volumen de elución para la hormona del crecimiento. Las fracciones recogidas contienen 2900 unidades de hormona humana del crecimiento, con una actividad específica de 2,6 unidades por cada mg de proteína. La electroforesis sobre gel de poli-acrilamida de 100 μ presenta sólo dos bandas, correspondientes a la hormona del crecimiento y a una forma desamida. - -

EJEMPLO 3

10. Se extraen 500 glándulas pituitarias humanas congeladas como se ha indicado en el ejemplo 1 con 2000 ml de tampón I. Después de centrifugar, se ajusta el valor de pH a 4,8. La mezcla se centrifuga. El precipitado se procesa para obtener la hormona pura del crecimiento por extracción con
15. tampón II, precipitación, redisolución en tampón III y cromatografía en columna como se ha descrito en el ejemplo 2. Se obtienen 3.400 unidades de hormona del crecimiento con una actividad específica de 2,7 unidades por cada mg de proteína.

20. El sobrenadante se mezcla con una disolución de 650 ml compuesta por 325 g de polietilenglicol 3000 y 380 ml de agua. La mezcla se centrifuga. El precipitado se somete a extracción con tampón II, precipitación con sulfato amónico, redisolución, tampón III y cromatografía en columna como se ha descrito en el ejemplo 2. Las fracciones recogidas que
25. contienen hormona del crecimiento contienen 4230 unidades de

hormona del crecimiento con una actividad específica de 2,6 unidades por cada mg de proteína. - - - - -

El rendimiento total a partir de las 500 glándulas pituitarias fue así de 7630 unidades. - - - - -

5. EJEMPLO 4

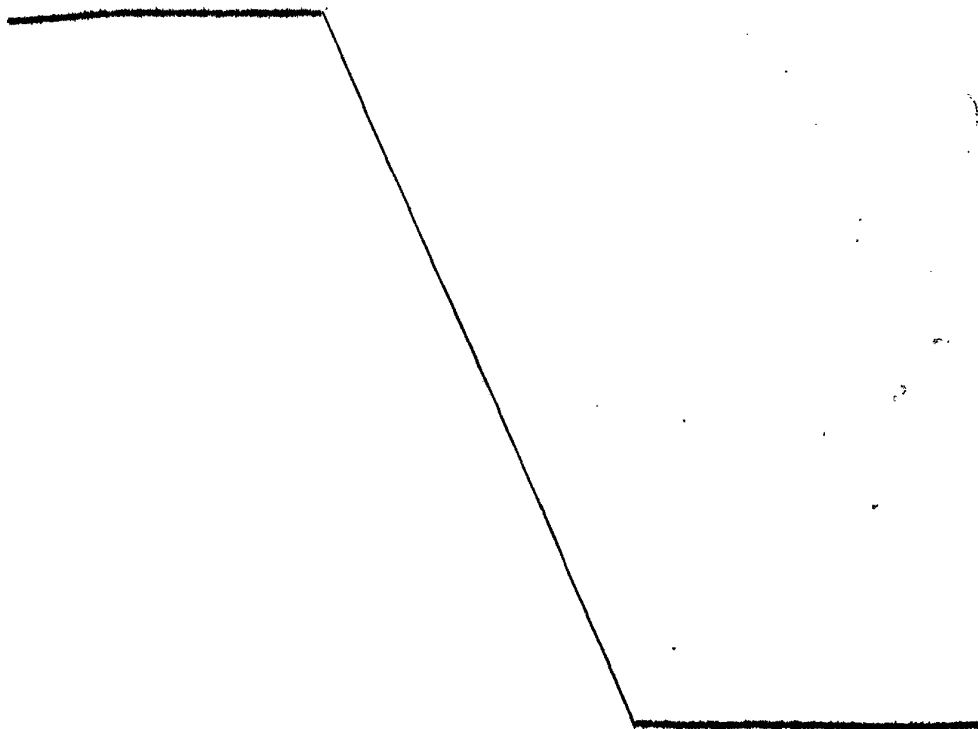
10. Se extraen 500 glándulas pituitarias humanas congeladas como se ha descrito en el ejemplo 1 con 2000 ml de tampón I. Después de centrifugar se ajusta el pH a 4,8. La mezcla se centrifuga de nuevo. El sobrenadante se mezcla con 1300 ml de disolución compuesta por 650 g de polietilenglicol 3000 y 750 ml de agua. La mezcla se centrifuga. El precipitado se somete a extracción con tampón II y a precipitación con sulfato amónico como se ha descrito en el ejemplo 2. La mezcla se centrifuga. A 2000 ml del sobrenadante se le añaden 15. 1000 ml de disolución compuesta por 500 g de polietilenglicol 3000 y 585 ml de agua. Después de agitar durante 1 hora la mezcla se centrifuga. El precipitado contiene las hormonas pituitarias FSH y LH. - - - - -

EJEMPLO 5

20. Se concentran, por ultrafiltración a 1 ml, 100 ml de medio de cultivo procedente del cultivo de tejidos de la anterior pituitaria que contiene 5 unidades de hormona del crecimiento. Se añaden 0,5 ml de una disolución acuosa que contiene 0,5 g de polietilenglicol 6000 por cada ml. El valor

de pH de la disolución se ajusta a 4,8. El precipitado se separa, se disuelve en 0,5 ml de agua y se aplica a una columna de una longitud de 63 cm y de un diámetro de 0,9 cm que contiene Sephadex G100, equilibrado con tampón III. La elución se efectúa con tampón III. Se recogen las fracciones que contienen hormona del crecimiento. Las fracciones recogidas contienen 1,0 unidades de hormona humana del crecimiento con una actividad específica de 2,0 unidades por cada mg de proteína. - - - - -

10. A los efectos consiguientes, se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

5. 1.- Método de obtención de hormonas proteínicas, derivadas de tejidos pituitarios, por medio del cual un extracto acuoso que contiene las hormonas proteínicas se somete a precipitación fraccionada con un agente precipitante, caracterizado porque el extracto acuoso procedente de tejidos pituitarios es precipitado con una o más porciones de polietilenglicol a un valor de pH de 4 a 6, ajustándose la cantidad de polietilenglicol de modo que la hormona o las hormonas proteínicas deseadas se aislen en fracciones, después de lo cual las fracciones se procesan para aislar las hormonas proteínicas en estado purificado. - - - - -

15. 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la precipitación con polietilenglicol se realiza a un valor de pH de 4,5 a 5,0. - - - - -

3.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el polietilenglicol utilizado como agente precipitante tiene un peso molecular de 3000 a 6000. - - - - -

20. 4.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la concentración de polietilenglicol en el extracto se aumenta escalonadamente de 0 a 30% (P/V). - - - - -

5.- Método según cualquiera de las reivindicaciones

1-4, caracterizado porque, para la recuperación de la hormona del crecimiento, se aíslan fracciones precipitadas del extracto cuando el extracto contiene de 10 a 14% (P/V) de polietilenglicol. - - - - -

5.

6.- "METODO DE OBTENCION DE HORMONAS PROTEINICAS".

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de catorce hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras. - - - - -

MADRID 29 JUL. 1977

P.A. M. CURELL SUÑOL

Alberca

S nca.