



Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

10	ES	11	NUMERO	12	AI
		21	<b>467067</b>		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			<b>1 FEB. 1978</b>		

**5 OCT. 1978**

**PATENTE DE INVENCION**

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
10397/77	1 Febrero 1977	Japón
64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C/2D	
67 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COMPUESTOS PROMOTORES DE SECRECIÓN DE INSULINA"		
68 SOLICITANTE (S)		
KAKENYAKU KAKO KABUSHIKI KAISHA		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
TOKYO (JAPON) - 4-7 Nihonbashi-Honcho, Chuo-Ku		
69 INVENTOR (ES)		
D. Motoyuki YAJIMA D. Koichi HOSODA D. Chikanori TOMIOKA y D. Michio UI		
70 TITULAR (ES)		
71 REPRESENTANTE		
D. Alfonso Durán Olivella		

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Invención se refiere a un procedimiento para la preparación y aislamiento de compuestos terapéuticamente activos y de modo particular, a la preparación de una sustancia conseguida por el cultivo de

5. cepas adecuadas del microorganismo Bordetella Pertussis (Fase I ó II) en medios de cultivo apropiados.

Los inventores han detectado en las células de los microorganismos que pertenecen a la Bordetella pertussis y en el producto que sobrenada su medio de cultivo, una

10. sustancia que tiene sorprendentes actividades farmacológicas promoviendo la secreción de insulina y manteniendo el nivel normal de azúcar en la sangre y que por lo tanto, posee elevada utilidad médica para el tratamiento de
15. diferentes tipos de diabetes y también como preventivo de la misma. Los inventores del presente procedimiento han logrado también aislar e identificar químicamente esta sustancia proteínica nueva como factor promotor de la secreción de insulina. Esta nueva sustancia proteínica, que se ha designado por los inventores Proteína activadora de los islotes ("Islets") ("Islets-Activating Protein")
20. (IAP), muestra una actividad sobresaliente en promover secreción de insulina para dosis extremadamente reducidas (aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal) y se demuestra útil para el tratamiento y prevención de diferentes
25. tipos de diabetes.

A continuación se describen de modo detallado las características más importantes de la invención. El

factor activo secretógeno de la insulina (que a continuación se le designará simplemente como "factor activo"), es una sustancia proteínica que se puede conseguir por el cultivo de microorganismos que pertenecen a la Bordetella per-

5. tussis (fase I ó II), conocidos como bacterias patógenas, preferentemente B. pertussis (fase I), en un medio sólido o líquido y recogiendo y purificando la sustancia adecuada de las células de cultivo bacteriano y del medio de cultivo.

10. La recogida y purificación del factor activo con respecto al cultivo se puede lograr por cualquiera de una serie de métodos generalmente utilizados en esta técnica, tales como el método de precipitación, método cromatográfico, método de criba molecular, método de electroforesis

15. y método biológico, utilizándose estos medios en combinación entre sí o solos, no quedando por lo tanto definida la presente invención por ningún método específico de recogida y purificación.

20. Se sugiere un procedimiento cromatográfico de columna como ejemplo de los métodos de recogida y purificación ventajosos del factor activo. De acuerdo con este procedimiento, el producto que sobrenada el medio de cultivo se hace pasar a través de una columna realizada a base de un producto de relleno tal como Hidroxiapatita

25. (Biochemical Industry Ltd.), CM-Sepharose Cl-6B (Pharmacia Fine Chemicals) o bien con A-Sepharose-4B (Pharmacia Fine Chemicals).

El factor activo es absorbido en dichas columnas de modo altamente selectivo y luego se eluye a partir de

- un eluyente adecuado tal como 0,1M fosfato en función equilibradora (pH7,0) conteniendo 0,5M NaCl. El producto purificado es dializado para eliminar sales innecesarias, proporcionando así el factor activo puro. El factor activo
5. se encuentra también presente en las células bacterianas cultivadas, de manera que, si se desea, dicho factor se puede recoger, por ejemplo, añadiendo NaCl a la suspensión de células para lixiviar el factor activo hacia la solución.
  10. El método llamado de precipitación por sulfato amónico, que se utiliza de manera extendida en esta técnica, es también útil para la preparación del factor activo. En este caso, se añade  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al producto que sobrenada al cultivo, hasta un punto aproximado de solubilidad saturada y se ajusta el pH a un valor comprendido entre 6 y 7 con solución diluida de amoníaco. A continuación el precipitado es lavado con agua y el factor activo es extraído del equilibrador Tris 0,1M (pH 8) que contiene 0,5M NaCl.
  15. Tal como se ha indicado anteriormente, los bacilos pertussis son conocidos como el organismo de Bordetella que produce el factor activo, pero las variaciones de estas bacterias patógenas, tales como las conseguidas por mutación mediante diferentes procesos, tales como cambio de la composición del medio, exposición a diferentes tipos de radiación tales como rayos ultravioleta o rayos X con el uso de un mutaje no químico, también son útiles como otras fuentes de factor activo.
  - 20.
  - 25.

Cualquier medio adecuado se puede utilizar para el cultivo según la presente invención, si bien se prefiere el cultivo por agitación de líquido en cuanto a actividad y rendimiento.

5. En cuanto a las propiedades micológicas y condiciones de cultivo de los microorganismos correspondientes a Bordetella, se puede ver en el Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 8, 1974, Baltimore, The Williams & Wilkins C.; J. Exp. Med. 129, 523 - 550 (1969);
10. y en Mycological Training Handbook, 3 rd Ed.p. 6 ff., 1972, Maruzen & Co.

- Teniendo en cuenta ciertos de sus más amplios aspectos, el proceso de acuerdo con la presente invención incluye el preparado de la proteína activadora de Islets
15. (IAP), cuya identificación química se ha llevado a cabo tal como se indica más abajo y también la preparación de los tipos más amplios de sustancias promotoras de la secreción de la insulina, que puede ser esencialmente similar o equivalente con naturaleza de proteína, que la
20. IAP.

Las propiedades químicas y físicas del factor activo obtenido en forma de IAP se describen más abajo.

Estado de existencia y características de solubilidad:

25. El polvo del factor activo conseguido a base de secado por congelación después de desalinización es no delicuescente, blanco o ligeramente marrón y se disuelve en agua a temperatura ambiente en una concentración de

- hasta 3 a 5 mg/ml. Cuando se pone en una solución 6N HCl, forma un precipitado insoluble blanco. Es soluble en piridina, sulfato dodecil sódico, 2-mercaptoetanol y solución de cistina. La añadidura de acetona en forma de
5. hielo seco o etanol, ácido tricloroacético o solución de cloruro de zinc o una solución que contenga varios otros tipos de iones metálicos a la solución del material activo purificado en frío (4°C), produce un precipitado blanco-turbio. Cuando se pone en una solución mezclada de agua y
10. de cloroformo o n-butanol, el factor activo aparece como insoluble en dicha solución y se acumula en la entrecara de ambos líquidos.

- Cuando se calienta una solución acuosa del factor activo a una temperatura de 80°C o más elevada, se
15. hace blanco-turbia. Asimismo, cuando este factor activo se disuelve en un equilibrador de fosfato 0,1M (pH 7,0) que contiene 0,5M NaCl y luego se dializa utilizando agua destilada como líquido externo, dicho factor se hace blanco-turbio de manera temporal pero si se continúa la
20. diálisis, el factor activo se disuelve de manera perfecta nuevamente y desaparece la turbiedad. Si una solución de alta concentración se somete a diálisis completa utilizando equilibrador acetato 0,01M (pH 4,5), el factor activo puede teñirse de un color pardo ligero y se disuel-
25. ve.

Peso molecular:

El peso molecular del factor activo determinado por filtración de gel en columna (2,8 x 80 cm) de Biogel

P-100 (BIO.RAD Corp.) equilibrado con fosfato 0,1M conteniendo 0,5M NaCl, fue de  $77.000 \pm 6.400$ .

Composición:

El contenido en proteínas determinado de acuerdo con el método de Lowry's, era de más de 95% en peso y el contenido de glúcidos medido por el método de fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue aproximadamente de 1% en peso. La concentración de lípidos se encontró por debajo del límite inferior de detección.

10. La siguiente literatura se tuvo en cuenta en la determinación de los componentes respectivos:

Proteínas

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.

15. Glúcidos:

Método fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobois, M., K.A. Giles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: Anal. Chem. 28 350, 1956.

Lípidos

20. El total de lípidos y conjugados de lípidos se midieron de acuerdo con el método Marsh y Weinstein (J.B. Marsh y D.B. Weinstein: J. Lipid Res., 7, 574, 1966) extrayendo el material antes y después de hidrólisis en cloroformo, cloroformo-metanol y heptano.

25.

El compuesto aminoácido del componente proteínico (promedio de proporción del compuesto  $\mu\text{M}/100\mu\text{M}$ , hidrólisis de 16 ó 24 horas a 110°C en 6 N HCl):

- Acido aspártico, 7,5; treonina, 7,3; serina, 6,4;  
ácido glutámico, 10,0; prolina, 5,8; glicina, 8,8;  
alanina, 9,3; cistina/2, 2,5; valina, 6,5;  
metionina, 2,8; isoleucina, 4,0; leucina, 7,8;  
5. tirosina, 6,5; fenilalanina, 3,7; lisina, 3,3;  
histidina, 1,5 y arginina, 6,4.

pH isoeléctrico:  $8,4 \pm 0,5$

Forma electroforética de disco:

- La acrilamida (concentrado de poliacrilamida,  
10. 7,5%; KOH-ácido acético glacial 1N en función equilibradora  
(pH 4,3) electroforesis de disco en condiciones de 30 µg,  
aplicación de corriente de 4 mA, duración hr/gel, teñido  
de negro de amida 10B y desteñido mediante 7% de solución  
de ácido acético proporciona una banda única muy definida  
15. a una distancia de  $2,221 \pm 0,061$  cm (tomando el separador  
gel como referencia).

Propiedades biológicas:

- El factor activo tiene una acción promotora de  
la secreción de insulina así como una acción de mejora-  
20. miento de la tolerancia a la glucosa en los mamíferos y  
estas acciones se mantienen durante un período de varias  
semanas hasta varios meses con una dosis única. La toxicidad  
aguda ( $LD_{50}$ ) es aproximadamente de 200 µg/kg de peso  
corporal en ratones de muestra (inyección intravenosa).

25. Ejemplo I

Preparación de sustancia activa proteínica

- 1. Bordetella pertussis liofilizado y preservado  
(Cepa Tohama Fase I) (suministrado por el Departamento de

- Bacteriología de la Universidad de Kitasato, Escuela de Ciencias Farmacéuticas) se cultivó en placas en un medio Bordet-Gengou a 37°C durante 2 días y luego una dosis en platino de dichas bacterias se inoculó en un frasco agitador de 500 ml en el cual se había introducido mediante una pipeta 200 ml de un medio modificado Cohen-Wheeler con resina de intercambio iónico añadida (medio CW) con una composición mostrada en la Tabla 1 y luego se sometió a cultivo por agitación a 37°C durante 20 a 22 horas. La concentración bacteriana en la solución de cultivo se midió mediante un espectrofotómetro (longitud de onda: 650 nm) y esta solución se añadió a un frasco agitador de 2 litros, en el cual se había introducido mediante pipeta un litro del medio CW al cual se había añadido resina para intercambio iónico, de forma que la concentración bacteriana final fuera aproximadamente de  $0,1 \times 10^9$  células/ml y esto fue seguido de un cultivo por agitación durante 48 horas (frecuencia de agitación, 97 veces/min) a 37°C.
5. 10. 15. 20.

Las propiedades bacteriológicas de la cepa antes indicada estaban de acuerdo con las descritas en la literatura anterior respecto a las cepas de Bordetella pertussis fase I.

Tabla I

Composición del medio modificado Cohen-Wheeler

	Casamino ácido	10 g
	Estrato de levadura	1 g
5.	Didrogenfosfato potásico	0,5 g
	Almidón soluble	2 g
	Solución de sulfato de cobre 0,5%	1 ml
	Solución de cloruro cálcico 1%	1 ml
	Solución de cloruro magnésico 4%	1 ml
10.	Polipeptona	5 g
	Solución de cistina 1%	2,5 ml
	Solución de sulfato de hierro 0,5%	1 ml
	Cloruro sódico	2,5 g

15. (En la utilización de este medio líquido, se añadió agua destilada para conseguir una cantidad total de 1000 ml y después de ajustar el pH a un valor 7,2 con solución al 20% de NaOH, la solución recibió otros 3 gr de una resina de intercambio aniónico (Diaion SA-20 AP, 20. Mitsubishi Kasei Co.) y luego se sometió a autoclave a 121°C durante 15 minutos).

La solución de cultivo por agitación durante 48 horas conseguida se calentó a 56°C durante 30 minutos y luego se sometió a centrifugación (a 15.000 r.p.m.) a 4°C, 25. para efectuar la separación en la parte que sobrenada y células bacterianas y el producto sobrenadante obtenido de esta manera de la solución de cultivo, se utilizó como material inicial para la purificación de dicho factor activo.

10 litros de dicha fase que sobrenada, después de ajustada a un pH 6,0 con HCl 1N, se aplicó a una columna de hidroxilapatita (2,5 x 4 cm) con un flujo de 200 ml/hora como primera fase purificadora.

5. La mayor parte de las proteínas pasaron por la columna sin ser absorbidas, y la actividad secretoria de la insulina (ver el método de medición de actividad que se describe más adelante) fue escasamente detectado. La concentración de proteínas se midió por el método Lowry y otros anotados en la parte baja de la tabla 2 que se muestra más adelante.

15. Para determinar las sustancias absorbidas, la columna se lavó primeramente con solución equilibradora de fosfato 0.01M (pH 6,0) y a continuación, después de elevar la concentración molar del fosfato equilibrador a 0,1 y del pH a 7,0, las proteínas absorbidas se eliminaron por elución sucesivamente. Sin embargo, el factor activo objetivo no se eliminó por elución en estas condiciones. Por lo tanto, se llevó a cabo una elución adicional con un 20. equilibrador fosfato de la misma composición pero conteniendo 0,5M NaCl. Bajo estas condiciones, el factor activo objetivo pudo recuperarse con un alto rendimiento de acuerdo con la proteína diluida (figura 1).

25. El factor activo obtenido se concentró y después de situarlo en una membrana de diálisis (Thomas Cat. NO. 3787-F25) con un peso molecular máximo permeable de 8000, se sometió a una doble diálisis (total 12 horas) con agua destilada y dos veces (total 12 horas) con fosfato equi-

librador 0,01M (pH 6,0). Para purificación posterior, se hizo pasar la solución conteniendo el factor activo dializado a través de una columna (1,5 x 10 cm) de Carboximetil Sepharose CL-6B, equilibrada con fosfato 0,01M (pH 6,0).

5. Los materiales no absorbidos en la columna no tenían actividad alguna. A continuación, después de elevar la concentración molar y el pH de la solución equilibradora de fosfato a 0,1 y 7,0 respectivamente, la dilución similar se llevó a cabo añadiendo 0,5M de solución salina, con
10. lo que se obtuvo el factor activo objetivo de acuerdo con la proteína diluida (Fig. 2).

- Dado que este producto contenía todavía una pequeña cantidad de impurezas en cuanto a electroforesis de disco, este factor activo se concentró posteriormente y
15. se situó después en una membrana de diálisis (de la misma norma que se ha indicado anteriormente), se sometió dos veces a diálisis (total 12 horas) con agua destilada y dos veces con fosfato equilibrador 0,01M (pH 7,0) (total 12 horas) y la muestra dializada se hizo pasar a través de
  20. una columna (1,5 x 8 cm) de Con A-Sepharose 4B que había sido equilibrada con fosfato 0,01M (pH 7,0).

- El desarrollo con el mismo equilibrador mostró por elución trazas de proteína, pero esta proteína no tenía actividad alguna. La dilución adicional con equilibrador
25. fosfato 0,1M (pH 7,0) conteniendo 0,5M de NaCl suministró el factor activo de acuerdo con la proteína eliminada por elución (Fig. 3).

Puesto que esta porción contenía todavía una

- pequeña cantidad de impurezas en cuanto a electroforesis de disco, esta parte de proteína se amasó y condensó y dializó un fosfato equilibrador 0,01M (pH 7,0) conteniendo 0,5M de NaCl, y la muestra dializada se sometió a filtra-
5. ción de gel a través de una columna (2,8 x 60 cm) de Biogel P-100 (BIO.RAD Co.) equilibrada con la misma solución equilibradora. Esto produjo el factor activo puro de acuerdo con la parte de proteínas mostrando su punto máximo con el peso molecular de 80.000 (Fig. 4).
10. La nueva proteína obtenida de esta manera se designó como proteína activadora de los Islets (IAP) tal como se ha dicho anteriormente.
- La recuperación de actividad, purificación y otros datos conseguidos en esta fase purificadora se
15. muestran en la tabla 2. La caracterización de esta sustancia es la que se describe en el párrafo anterior.

Tabla 2

	Fases	Canti- dad de la so- lución (ml)	Concen- tración de pro- teína (µg/ml)	Protei- nas to- tales (mg)	Activi- dad es- pecífica (unida- des µ/g)	Rendi- miento (%)	Purifi- cación
5.	Fase que sobrena- da en el medio de cultivo	10.000	2.000	22.000	0,318	100	1
10.	Hidroxia patita col. chrom.	125	159	19,9	193,0	55	607
	CM-Sepha- rose col. chrom.	45	251	11,3	321,0	52	1.009
15.	Con A-Sepha- rose col. chrom.	50	176	8,8	380,0	48	1.195
	Biogel P-100 col. chrom.	40	168	6,7	429,0	41	1.349

20.

(Nota)

La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry y otros (Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall: J. Biol. Chem. 193 265, 1951) y se utilizó como normal la albúmina de suero bovino.

25.

La pureza de la sustancia obtenida en la fase final antes descrita, designada proteína activadora de los

Islets (IAP), se determina de acuerdo con la electroforesis de disco con gel de poliacrilamida (concentración de poliacrilamida 7,5%, solución equilibradora 1N de KOH-acetato glacial (pH 4,3)).

5. El método de J.V. Maizel, Jr. (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 13, 483) se utilizó para el proceso experimental.

La cantidad de muestra por gel fue de 30 µg (como proteína), y el experimento se condujo aplicando una corriente de 4 mA durante 2 horas, tñiniendo con blanco de amida 10B y destñiendo con solución de ácido acético al 7%. Los resultados conseguidos se muestran en la Fig. 5 (dibujo de las condiciones del gel y de la forma electroforética conseguidas utilizando un densitómetro). Se

15. observó que la muestra contenida en esta fase final es una sustancia única perfectamente libre de impurezas y que la actividad promotora de secreción de insulina definida en el ejemplo 2 correspondía bien con esta sustancia aislada. Para determinar la estructura subunitaria del IAP, se
20. sometió a la siguiente electroforesis de SDS (dodecilsulfato sódico) poliacrilamida de acuerdo con el método Shapilo y otros (A.L. Shapilo y otros: Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 28 815).

25. Se añadió una muestra de IAP de 50 µg/tubo (como proteína) a una mezcla de 1% SDS, 1% de 2-mercaptoetanol y urea 4M y después de incubación de 2 horas a 37°C, se aplicó la mezcla a un gel de poliacrilamida al 10% conteniendo 1% de SDS y después de una aplicación de corrien-

te eléctrica durante 4 horas con intensidad 8mA/gel, se  
teñió con Coomassie Blue y se destiñó con ácido acético al  
7,5%. Los resultados se muestran en la Fig. 6 (dibujo de  
estado de gel y de forma electroforética utilizando un  
5. densitómetro).

-2. Se sometió Bordetella pertussis liofilizada  
y preservada (Cepa NIH 114(3779B) (suministrada por el  
Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias  
Farmacéuticas de la Universidad Kitasato), a cultivo de  
10. agitación y separación de una misma manera que se ha  
descrito en el ejemplo I-1, obteniéndose 10 l de líquido  
de cultivo sobrenadante.

El producto que sobrenada o sobrenadante obte-  
nido de esta manera se dividió en dos partes una de las  
15. cuales se aplicó a una columna de hidroxapatita (2,5 x 4  
cm) con un flujo de 200 ml/hora después de ajustar el pH  
del sobrenadante a 6,0 con HCl 1N. La columna se lavó con  
agua y luego el producto absorbido se diluyó con solución  
equilibradora de fosfato 0,1M conteniendo 0,5M NaCl (pH  
20. 7,0).

El producto de elución así obtenido se puso en  
la membrana de diálisis con el máximo peso molecular  
permeable de 8.000 (Thomas Cat. Nº 3787-F25) y se dializó  
3 veces contra agua destilada (18 horas en total) obte-  
25. niéndose de esta manera la sustancia activa. A continua-  
ción la sustancia obtenida se puso a tratamiento de lio-  
filización y esto produjo un polvo fino de proteína de  
color blanco parduzco (muestra A) que es equivalente a

IAP, factor promotor de secreción de insulina.

Los otros 5 ℓ de líquido de cultivo sobrenadante recibieron la añadidura de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta 90% del valor de saturación (ajustando el pH a 6,5 con solución amónica débil en agua) precipitándose de esta manera casi todas las proteínas. A continuación el precipitado se lavó completamente con agua y luego se lixivió con solución equilibradora (pH9) de 0,1M Tris-0,5M NaCl y se obtuvo la solución extraída. La solución extraída conseguida se neutralizó en primer lugar con 1N HCl y luego se dializó 3 veces (18 horas en total) contra agua destilada utilizando la membrana de diálisis antes mencionada, para obtener la sustancia activa, consiguiéndose así 11,2 mg de polvo liofilizado (muestra B).

15. -3. Bordetella pertussis (Cepa Maeno Fase I)

Con la utilización de la cepa Maeno Fase I liofilizada y preservada de Bordetella pertussis, (Suministrada por el Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Kitasato) se siguieron los mismos procedimientos descritos en el ejemplo I-1 y se obtuvieron 23,6 mg y 10,8 mg de las muestras de polvo liofilizado de las sustancias activas (muestras C y D).

Actividad y toxicidad agudas de cada muestra

25. Se obtuvieron la actividad específica de cada muestra de acuerdo con el método descrito en el ejemplo II en el que se indica a continuación (Tabla 3).

Tabla 3

	Muestra	Actividad específica (unidades/ $\mu$ g)
5.	A	57,1
	B	93,0
	C	127,2
	D	81,0

10. La toxicidad aguda (LD 50) de cada muestra se indica en la Tabla 4.

Tabla 4

		<u>LD 50 (<math>\mu</math>g/kg peso corporal)</u>
15.	Muestra	Inyección intravenosa en ratas
20.	A	1.620
	B	2.510
	C	2.890
	D	3.020

25. Como consecuencia las muestras de polvo de sustancias activas también se pueden utilizar como medi-

camento o profiláctico de diabetes tal como en el caso del IAP y sus dosis efectivas son de 1-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (peso corporal).

-4. Bordetella pertussis (Cepa Tohama, Fase 1)

5. (suministrada por el Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Kitasato) se cultivó del mismo modo descrito en el ejemplo I-1 y el sobrenadante del medio de cultivo conseguido por separación de organismo del mismo se utilizó como material
10. de inicio. Se vertió acetona enfriada mediante hielo seco en 100  $\ell$  de producto sobrenadante, sacudiendo bajo enfriamiento por hielo para alcanzar la concentración final de 60%. Después de ello el precipitado fué recogido con un separador centrífugo continuo (5000 r.p.m., 4 $^{\circ}$ C). El
15. precipitado obtenido de esta manera se secó disolviéndose en 500 ml de fosfato equilibrador 0,01 M (pH 6,0) y luego se aplicó a una columna (5 cm x 4 cm) de hidroxilapatita. La actividad se acumuló en la sustancia eluida con fosfato equilibrador 0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M. La
20. sustancia eluida se recogió, se condensó y dializó contra fosfato equilibrador 0,01 M (pH 6,0) y luego se aplicó a una columna de CM-Sephrose CL-6B (2,5 cm x 25 cm) que había sido equilibrada con la misma sal equilibradora y la sustancia activa se eluyó con fosfato 0,1 M que contenía
25. NaCl 0,5 M. Posteriormente, la sustancia activa eluida de esta manera se recogió, se condensó y se dializó contra fosfato equilibrador 0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M. Después de ello la sustancia activa se aplicó a una

- columna de Biogel P-150 (2 cm x 105 cm) que había sido equilibrada con fosfato 0,1 M conteniendo NaCl 0,5 M y urea 4M. Esta sustancia activa era una proteína que mostraba una punta de peso molecular aproximadamente 80.000 y
5. se consiguieron 38 mg de su estado polvo liofilizado. La composición química de la sustancia conseguida era la siguiente; proteína 95% en peso y superior, carbohidrato 1 - 2% en peso, no se detectó lípido alguno. La actividad específica era de 930 unidades/ $\mu$ g.
10.                   -5. Bordetella pertussis liofilizada y preservada (Cepa Tohama, Fase I) (Suministrada por el Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Kitasato) se sometió a cultivo con agitación de la misma manera que en el ejemplo 4 y se
15. obtuvieron 100 l de productos sobrenadantes separando las células bacterianas del líquido de cultivo. El producto sobrenadante conseguido se añadió a una solución acuosa de cloruro de zinc al 50% sacudiendo a temperatura baja para ajustar su pH a un valor 6,0 (concentración final 1%). El
20. precipitado se disolvió en fosfato disódico al 10% y se situó en una membrana de diálisis, dializándose luego con agua, siguiendo un equilibrado con fosfato 0,01 M. Esta solución se aplicó a continuación a una columna (10 cm x 5 cm) de hidroxilapatita y se lavó con fosfato 0,1 M (pH
25. 7,0) y luego se eluyó con fosfato 0,1 M conteniendo NaCl 0,5 M. El producto de elución conseguido se condensó y se aplicó a una columna (2,5 cm x 100 cm) de Sephacryl S-200 (Pharmacia Fine Chemicals) y luego se diluyó con fosfato

0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M y urea 4M. Esto fue seguido de filtración de gel y la sustancia activa fue separada.

- El peso molecular de la sustancia activa conseguida se estimó aproximadamente en 72.000 mediante filtración de gel y se consiguieron 40 mg de producto seco en polvo. La sustancia conseguida tenía una composición química de aproximadamente 95% en peso e incluso superior, 1-2% de carbohidrato y no se detectó lípido alguno. La actividad específica fué de 890 unidades/ $\mu$ g.

5. -6. Bordetella pertussis (Cepa Tohama, Fase I) (Suministrada por el Departamento de Bacteriología, Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Kitasato) fue cultivada en un medio Bordet-Gengou a 37 $\circ$  C durante 2 días y posteriormente en producto Bordet-Gengou a 37 $\circ$  C durante 20-24 horas y luego se inculó una dosis en platino de dicha bacteria a un medio sólido Cohen-Wheeler modificado al que se había añadido carbón activo (medio CA) teniendo la composición mostrada en la tabla 5 y sometién dose a cultivo durante 48 horas a 37 $\circ$  C, suspendién dose 5Kg de células bacterianas húmedas conseguidas en 5  $\ell$  de agua destilada y retenién dose 56 $\circ$  C durante una hora.

- Después de enfriar, la suspensión recibió una añadidura de timerosal para alcanzar su concentración final (0,01 %) y se sometió a centrifugación (15.000 r.p.m. x 30 minutos) para recoger las células bacterianas. Las células recogidas se suspendieron en agua destilada

conteniendo uréa 4M y NaCl 1 M, y luego se sometieron a un equipo ultrasónico (Tomy Precision Machinery Co.) a temperatura baja (4°C) para destruir las células bacterianas.

- La suspensión resultante se sometió a centrifugación ( 15.000 r.p.m. x 30 minutos) y el producto sobrenadante libre de precipitado se dializó con agua y luego se equilibró con fosfato 0,1 M (pH 0,6) seguido de aplicación a una columna (10 cm x 5 cm) de hidroxilapatita. Después de lavar las impurezas absorbidas con fosfato 0,01 M (pH 0,6) y fosfato 0,1 M (pH 7,0) la sustancia activa se diluyó con fosfato 0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M.

- La sustancia activa conseguida de este modo se equilibró con fosfato 0,01 M (pH 6,0) y luego se aplicó a una columna (2,5 cm x 30 cm) de CM-Sepharose CL-6B. La columna se lavó en primer lugar con fosfato 0,05 M (pH 6,0) y luego se eluyó con fosfato 0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M para separar por elución la sustancia activa. La sustancia eluida se condensó y disolvió en fosfato 0,1 M (pH 7,1) conteniendo urea 4M y NaCl 0,5 M y luego se aplicó a una columna (2,5 cm x 115 cm) de Sephacryl S-200.

Esto fue seguido de elución con disolvente y se consiguieron 40 mg de sustancia activa.

- El peso molecular de esta sustancia medido por filtración de gel se supuso de 74.000 y tenía una composición química de más de 95% en peso de proteína, 2% en peso de carbohidrato y no se detectó lípido alguno. La

actividad específica fue de 920 unidades/ $\mu$ g.

Tabla 5

Composición del medio CA

5.	Casamino ácido	10 g
	Extracto de levadura	1 g
	Dihidrogenofosfato potásico	0,5 g
	Almidón soluble	1,5 g
	Solución de sulfato de cobre 0,5%	1 ml
	Solución de cloruro magnésico 1%	1 ml
10.	Polipeptona	5 g
	Solución Cistina 1%	2,5 ml
	Solución del sulfato de hierro 0,5%	1 ml
	Cloruro Sódico	2,0 g
	Agar-agar en polvo	18 g
15.	Agua destilada	1.000 ml

(En la utilización de este medio sólido, se disolvió por calentamiento después de ajustar el pH a 7,2, recibiendo posteriormente la añadidura de 5 gr. de carbón activo en polvo y luego se sometió a la acción de autoclave a 121 $\circ$  C durante 20 minutos.

20. -7. Se pueden citar varias cromatografías de afinidad utilizando las propiedades del IAP como método efectivo de preparación de la sustancia activa. Este método, combinado de modo apropiado con una serie de procedimientos de preparación tal como se describe en el ejemplo 1, permite omitir parcialmente las fases de

preparación. Además, tanto la purificación como el rendimiento de este método son casi los mismos que en el ejemplo 1. El método se describe en lo que sigue.

- A) Se cultivó Bordetella pertussis liofilizada
5. y preservada (Cepa Tohama, Fase 1) (Suministrada por el Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Kitasato) del mismo modo que en el ejemplo 1. 10 ℓ del producto sobrenadante conseguidos en el cultivo líquido se aplicaron a una
10. columna ( tamaño de la columna 5 cm x 2 cm, flujo 60 ml/hora) de hidroxilapatita y luego se lavó con 300 ml de fosfato 0,01 M (pH 7,0). Esto fue seguido de la acción de fosfato 0,1 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,5 M con un flujo de 15 ml /hora, para separar por elución la sustancia
15. activa. La sustancia activa conseguida se condensó hasta 15 ml mediante Ficol 400 (Pharmacia Fine Chemicals) y luego se dializó 4 veces para un periodo total de 24 horas con 2 ℓ de agua destilada y después se dializó 4 veces para un periodo total de 24 horas con 1 ℓ de acetato 0,01
20. M (pH 4,5) conteniendo cloruro sódico 0,1 M o cloruro de litio- cloruro de hidrógeno 0,1 M (pH 4,5) para equilibrar. El producto se aplicó a una columna de p-acetoximercurianilina-Sepharose 6 MB (se hace referencia al método de preparación que se describe más abajo, tamaño de columna 1,2 cm x 8 cm ) que había sido equilibrada con el
25. mismo equilibrador que se ha mencionado antes con un flujo de 5 ml/hora y después de lavar bien con el mismo producto equilibrador, la sustancia activa absorbida se separó por

- dilución con la misma sustancia equilibradora a la que se había añadido L-cistina 0,01 M. La sustancia activa obtenida se recogió y luego se condensó aproximadamente a 5 ml. con Ficol-400, se dializó tres veces durante un período total de 12 horas contra fosfato 0,1 M (pH 7,0) del cual 2 l contenían urea 4 M y cloruro sódico 0,5 M para equilibrar y posteriormente se equilibró con el mismo producto equilibrador. La filtración de gel se llevó a cabo en una columna de Sephacryl S200 (2,8 cm x 95 cm) (Pharmacia Fine Chemicals).

- La sustancia activa se obtuvo como producto puntual con pesos moleculares de  $65.000 \pm 7.000$  (lo cual se determinó posteriormente haciendo pasar proteína marcadora) coincidiendo con un tipo de actividad. La sustancia activa se sometió a diálisis (contra 2 l de agua destilada, 5 veces en 48 horas) y luego se liofilizó para obtener 2,1 mg de polvo blanco.

- Este producto dió una banda única en electroforesis de gel de poliacrilamida (gel de pH 4,3) y tenía una composición de más de 98% de proteínas, y ningún carbohidrato ni lípido.

(Nota) Método de preparación del p-acetoximercurianilina (PAMA) - Sepharose 6MB:

- 4 g de Sepharose 6MB activada mediante CNBr (Pharmacia Fine Chemicals) es lavada repetidamente y tratada en un filtro de cristal utilizando 1 l de  $10^{-3}$  N NCl. Se prepara separadamente una solución disolviendo 172 mg (0,5 mM) de p-acetoximercurianilina en 50 ml de dimetilfor-

- mamida en solución al 60% de bicarbonato sódico equilibrador 0,1 M (pH 8,3, conteniendo cloruro sódico 0,5 M). Después de completar el lavado y tratamiento del gel, la solución antes mencionada es añadida y la mezcla es bien agitada a temperatura ambiente (22 a 25 °C) durante 2 horas. Después de completar la reacción, el producto es lavado con el mismo producto equilibrador y a continuación añadiendo 50 ml de monoetanolamina 1 M (pH 9,0) al gel, la mezcla es agitada enérgicamente a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación el gel es filtrado por succión con un filtro de cristal, es lavado varias veces alternativamente con 1 ℓ de borato equilibrador 0,1 M (pH 8,5) y 1 ℓ de acetato equilibrador 0,1 M (pH 4,0) y finalmente se equilibra con acetato 0,01 M (pH 4,5, conteniendo cloruro sódico 0,1 M) o cloruro de litio - cloruro de hidrógeno 0,1 M (pH 4,5). Por otra parte, el gel es tratado previamente con el mismo equilibrador conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol y luego se lava suficientemente y se equilibra con el mismo producto equilibrador.
5. 10. 15. 20. 25.
- B) Bordetella pertussis liofilizada y preservada (Cepa Tohama, Fase 1) (suministrada por el Departamento de Bacteriología de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Kitasato) se cultivó del mismo modo que en el ejemplo 1 y 10 ℓ de líquido sobrenadante conseguido del cultivo líquido se aplicaron a una columna (tamaño de la columna 5 cm x 2 cm; flujo 60 ml/hora de hidroxilapatita y luego se lavaron con 300 ml de fosfato equilibrador 0.01 M (pH 7,0) seguido de un flujo de fosfato

equilibrador 0,1 M (pH 7,0) con un flujo de 15 ml/hora.

La sustancia activa conseguida se condensó hasta aproximadamente 15 ml con Ficol 400 (Pharmacia Fine Chemicals) y luego se dializó 4 veces durante un periodo

5. total de 24 horas contra 2 ℓ de agua destilada y después se dializó nuevamente 4 veces durante un periodo de 24 horas contra 1 ℓ de fosfato 0,01 M (pH 7,0) para equilibrar.

La sustancia activa se aplicó a una columna de anti-anticuerpo IAP-Sepharose 4B (Se hace referencia a la nota descrita más abajo, tamaño de columna 1,8 cm x 13 cm) y luego se lavó bien con aproximadamente 200 ml de fosfato 0.01 M (pH 7,0) conteniendo NaCl 0,1 M, seguido de elución con glicina-cloruro de hidrógeno 0,1 M (pH 3,0) conteniendo 2 mM de EDTA y NaCl 0,15 M, según un flujo de 60 ml/hora.

15. El eluido se neutralizó enseguida con equilibrador glicina 1 M (pH 11,5).

La sustancia activa se recogió y dializó ( 5 ℓ , 3 veces, 48 horas) contra agua destilada para conseguir 1,9 mg de polvo blanco.

20. El peso molecular de esta sustancia medido por filtración de gel fue de  $70.000 \pm 5.000$  y dió una banda única en electroforesis de gel de poliacrilamida (gel de pH 4,3). Tenía la composición química de proteínas aproximadamente 97% e incluso superior, carbohidratos 1% e
25. incluso inferior y no se detectó lípido alguno.

(Nota) Método de preparación de anti-anticuerpo IAP-Sepharose 4B:

Se lavan 10 g de Sepharose 4B activada con CNBr

(Pharmacia Fine Chemicals) y se trata repetidamente en un filtro de cristal utilizando 2 l de 10<sup>-3</sup> NHCl. Se prepara separadamente una solución disolviendo 100 g de anti-IAP anticuerpo en 50 ml de bicarbonato sódico equilibrador 0,1 M (pH 8,3) conteniendo NaCl 0,5 M. Inmediatamente después de completarse el lavado y el tratamiento del gel, se añade la solución antes mencionada y la mezcla es bien agitada a temperatura ambiente (22-25 ° C) durante unas 2 horas.

10. Después de completar la reacción, el gel es filtrado por succión con un filtro de cristal y es lavado varias veces con el mismo equilibrador para eliminar el excesivo anti-anticuerpo IAP, luego se añaden 100 ml de monoetanolamina 1 M y la mezcla es bien agitada durante 2 horas a temperatura ambiente para conseguir una buena mezcla.

Después de la reacción se lleva a cabo el lavado varias veces con el equilibrador mencionado y luego se lava con 1 l de ácido acético equilibrador 0,1 M (pH 4,0) conteniendo NaCl 0,5 M. (Este procedimiento se repite 3 veces cambiando el pH).

Finalmente el producto se lava con 1 l del mismo equilibrador antes mencionado. (La preservación consigue la gama de 4 - 8°C).

25. Ejemplo II  
Efectos farmacológicos de la sustancia proteínica activa.

-1. Determinación de la actividad promotora de la secreción de insulina.

La actividad promotora de secreción de insulina del IAP y su equivalente se puede determinar midiendo la reacción animal a varios tipos de estimulantes de la secreción de insulina y usualmente se utiliza glucosa como estimulante para esta finalidad.

5.

Animales de prueba

Ratones machos wistar ( con peso corporal de 130 a 140 gr).

Método de prueba

10.

Las sustancias algo purificadas o bien purificadas activas, de diferentes actividades, se disuelven en una solución fisiológica salina y 0,2 ml de cada una de estas soluciones se inyectan por vía intravenosa, bajo anestesia por eter, en la vena femoral de las ratas de

15.

prueba y se mide la actividad secretógena de la insulina de cada sustancia tres dias más tarde. Las ratas estuvieron en ayunas durante 18 a 20 horas antes del experimento.

20.

Para la medición de la actividad se recoge 0,1 ml de sangre de la vena de cola de cada rata, seguido ello inmediatamente por inyección intraperitoneal de 30%

25.

de solución de glucosa en una proporción de 1 ml por 100 gr del peso corporal y exactamente 15 minutos más tarde se recogen nuevamente 0,1 ml de sangre de modo similar. La actividad secretógena de insulina es determinada a partir de la diferencia en el nivel de glucosa de la sangre y la concentración de insulina en la sangre antes y después de la acción de la glucosa. El nivel de glucosa de la sangre se mide por el método de glucosa oxidasa y la concentra-

ción de insulina por el método de doble anticuerpo.

La solución parenteral para inyección intravenosa utilizada para el siguiente experimento farmacológico se compone del mismo compuesto antes mencionado. Los métodos de medición utilizados para la determinación de glucosa de la sangre e insulina en el plasma están de acuerdo con la siguiente literatura y equipos, respectivamente.

5. Nivel de glucosa en la sangre: Método de glucosa oxidasa.
10. Bergmeyer, H. -U, y Bernet, E. en "Methods of enzymatic analysis", Bergmeyer, H. -U., eds, New York Academic Press P 123 (1963).

Glucoestado

Concentración de insulina: Método de doble anticuerpo

15. Morgan, C.R., y Razarow, A.: Diabetes, 12 115 (1963) equipo de ensayo de inmunidad de insulina por Dainabot Radioisotope Laboratories:  
Método de cálculo de la actividad secretora de insulina.

En primer lugar, se obtienen los valores de

20.  $\Delta I/\Delta G$  del grupo al que se ha suministrado la sustancia activa y del grupo de control, de la ecuación siguiente:

$$\Delta I/\Delta G (\mu U/mg) = \frac{\text{Concentración de insulina en el plasma después de la carga de glucosa } (\mu U/ml) - \text{Concentración de insulina en el plasma antes de la carga de glucosa } (\mu U/ml)}{\text{Concentración de glucosa en la sangre después de la carga de glucosa } (mg/ml) - \text{Concentración de glucosa en la sangre antes de la carga de glucosa } (mg/ml)}$$

25.

La utilización del nivel de glucosa en la sangre para el cálculo de la actividad es por razón de que la cantidad de insulina secrecionada queda grandemente afectada por el nivel de azúcar en la sangre.

5. La unidad de cada sustancia activa es proporcionada por la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Valor } \Delta I/\Delta G \text{ promedio del grupo tratado}}{\text{Valor } \Delta I/\Delta G \text{ promedio del grupo de control}}$$

$$\text{Unidad} = \frac{\text{Valor } \Delta I/\Delta G \text{ promedio del grupo tratado}}{\text{Valor } \Delta I/\Delta G \text{ promedio del grupo de control}} \times 100$$

10. Valor  $\Delta I/\Delta G$  promedio del grupo de control

La actividad específica de cada sustancia viene dada por la división de la unidad por la cantidad de proteína (método Lowry y otros).

15. . Relación entre dosis y respuesta.

La unidad y dosis (como proteína) del IAP obtenido del ejemplo I-1 se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

	Dosis (ng/ratón)	Unidad*
5.	8	62
	16	53
	32	54
	63	81
	125	104
10.	250	129
	500	208
	1.000	445
	2.000	571

15. \* Valor medio para 5 animales

La muestra de IAP purificado tiene la relación dosis-respuesta sigmoide sin embargo se selecciona una parte de carácter lineal en el mayor grado posible (250 ng - 1.000 ng) para calcular la unidad y la fase de purificación tanto del IAP como de su equivalente.

20. - 2. Resumen de los efectos farmacológicos de la sustancia proteínica activa.

Esta sustancia es particularmente destacada por su prominente actividad promotora de la secreción de insulina, pero también tiene otros efectos farmacológicos útiles tales como el mejoramiento de la tolerancia de la

25.

glucosa, refuerzo de la respuesta secretora de insulina, promoción de curamiento de diabetes inducida por estreptozotocina y mejora de la tolerancia de la glucosa en diabetes hereditaria. Además, estas actividades se mantienen

5. durante semanas hasta varios meses con una administración única de esta sustancia. En vista de que los mismos fenómenos fueron apreciados de modo completo en los animales de prueba incluidos ratones, ratas y perros, se considera que las acciones farmacológicas de esa sustancia no varían en

10. ningún grado sustancial de acuerdo con la diferencia en las especies animales.

Se considera que esta sustancia encuentra su mejor aplicación como medicina curativa para la diabetes. En la actualidad, la medicación para la diabetes depende

15. de la inyección de insulina o la administración oral de drogas antidiabéticas, pero éstas son para el tratamiento meramente sintomático y, según el estado actual, la diabetes se puede considerar una enfermedad incurable.

Además, el paciente debe acudir a un centro de

20. tratamiento cada día para la inyección de insulina y además, la administración de las drogas antidiabéticas tienen el peligro de causar un descenso anormal del nivel de glucosa en la sangre. La ventaja especial de esta sustancia es que no solamente tiene por sí misma una

25. actividad secretora prominente de la insulina, sino que también tiene la acción de aumentar la concentración de insulina en la sangre solamente cuando el nivel de glucosa de la sangre se ha elevado por diferentes condiciones

- (estado hiperglicémico, especialmente en cargas de glucosa tales en la ingestión de alimentos) y para retornar rápidamente el nivel elevado de glucosa en la sangre al valor normal. Otra ventaja sobresaliente de esta sustancia es
5. que su actividad se mantiene durante un periodo de varias semanas hasta varios meses, mediante una administración única. Por lo tanto, en caso de que la reacción secretora de insulina al nivel de glucosa en la sangre haya disminuido, la administración de esta sustancia provoca una
10. actividad secretora normal de la insulina. Gracias a estas propiedades, esta sustancia encuentra un amplio campo de aplicaciones, es decir, no solamente es útil como remedio para la diabetes, complicaciones de la misma y enfermedades geriátricas que se originan de la diabetes, sino que
15. también se demuestra efectiva en la aplicación a la fase prediabética como preventivo, remedio o diagnóstico para la diabetes juvenil, para la cual no existen en la actualidad medios efectivos disponibles.

20. - 3. Actividad promotora de la secreción de insulina.

Esta acción es una de las acciones notables de la sustancia de referencia, sobre la cual se llevaron a cabo experimentos en ratas (ratas macho de la raza Wistar) y perros (tanto machos como hembras de tipo Beagle).

25.

Ratas

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las utilizadas en la medición de las actividades

- antes descritas, pero en este experimento, la reactividad a los correspondientes estimulantes de secreción de insulina se midió al tercer día después de la administración del IAP a las ratas y se comparó con ratas normales (control) (Tabla 7). Como compensación de la glucosa que es el factor más fisiológico, se apreció un marcado incremento de concentración de insulina en la sangre en el grupo de control a pesar de la diferencia de administración de glucosa. Se observó también un aumento significativo en la reactividad a los estimulantes de hormonas tales como glucagón (1mg/Kg) y epinefrina (200 µg/Kg). Se observó también una elevada actividad secretora de la insulina por parte de la tolbutamida (200 mg/Kg) y glibenclamida (2 mg/Kg) que se utilizan corrientemente de modo clínico como drogas antidiabéticas. Se comprobó de dichos resultados que la administración de la sustancia actual puede reforzar de modo destacado la reactividad del organismo a los estimulantes de secreción de insulina.

Tabla 7

Promoción de reactividad a varios estimulantes de la insulina en ratas pretratadas con IAP

		Grupo de control			Grupo tratado		
5.		Antes de la administración * 1)	Después de la administración	In-cre-men-to	Antes de la administración	Después de la administración	In-cre-men-to
		( $\mu$ U/ml)	( $\mu$ U/ml)	( $\mu$ U)	( $\mu$ U/ml)	( $\mu$ U/ml)	( $\mu$ U)
10.	* 2) Glucosa oral 0,5g * 3) 15	16 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4	74	25 $\pm$ 5	227 $\pm$ 47	202
	Intraperitoneal 0,3 g 15	26 $\pm$ 3	68 $\pm$ 12	42	55 $\pm$ 5	401 $\pm$ 114	346
15.	Intravenosa 0,05 g 15	16 $\pm$ 1	27 $\pm$ 3	11	25 $\pm$ 5	56 $\pm$ 6	31
	Glucagón via intravenosa 0,1 mg 5	24 $\pm$ 3	56 $\pm$ 5	32	28 $\pm$ 4	115 $\pm$ 3	87
20.	Epinefrina subcutánea 20 $\mu$ g 30	22 $\pm$ 5	29 $\pm$ 4	7	30 $\pm$ 3	102 $\pm$ 15	72
	Glimenclamida oral 0,2mg 60	13 $\pm$ 4	52 $\pm$ 16	39	25 $\pm$ 3	82 $\pm$ 11	57
25.	Tolubutamida intraperitoneal 20mg 60	23 $\pm$ 6	46 $\pm$ 8	23	55 $\pm$ 4	247 $\pm$ 73	192

- \* 1) Concentración de insulina en el plasma.
- \* 2) Dosis/100 g de peso corporal
- \* 3) Tiempo (en minutos) de la extracción de sangre después de la administración

1 µg de IAP se inyectó por vía intravenosa 3 días antes del experimento.

La tabla muestra valores medios y errores estándar para 5 animales en el caso correspondiente.

5. Se administró IAP con varios valores de unidad intravenosamente a perros y 3 días más tarde glucagón (25 µg/kg de peso corporal, inyección intravenosa) o glucosa (0,3 g/Kg peso corporal, inyección intravenosa), llevándose a cabo estímulo para examinar la actividad promotora de la secreción de insulina. Los animales de prueba se trataron durante 18 horas antes del experimento.

- Los resultados experimentales de la estimulación por glucagón se muestran en la tabla 8. Se observó una promoción, si bien ligera, de la secreción de la insulina durante los 5 minutos de control después de la administración de glucagón según una dosis de 50 ng (como proteína, la misma en lo siguiente si no se especifica lo contrario) /Kg (peso corporal) y se promovió secreción de insulina proporcionalmente al incremento de la dosis, alcanzando sustancialmente la mayor reacción en la dosis de 1 µg/kg. Se observó una potenciación similar de la actividad secretora de insulina en la glucosa (administraciones oral e intravenosa) y acciones de la epinefrina (Tabla 9). Estos resultados indican que se consigue un refuerzo sustancial de la reactividad a la secreción de la insulina también en los perros, por la administración del IAP.

Tabla 8

Potenciación de la secreción de la insulina  
después de la administración de glucagón a perros  
pretratados con IAP.

5.

---

Tiempo (minutos) después de la administración de glucagón	0	5	15	30	45	60
--	---	---	----	----	----	----

Dosis

10.

Nota 1

---

Grupo de control	3	31	32	16	10	8
Grupo tratado						
0,05 µg/kg	2	50	43	18	17	6
0,1	3	73	37	9	5	2
0,5	3	196	100	24	11	5
1,0	2	360	230	10	13	7
2,0	2	320	60	19	6	8

20.

Nota 1: µU/ml media de 3 animales en casos respecti-  
vos.

Tabla 9

Refuerzo de la secreción de insulina después de las acciones de glucosa y epinefrina en perros pretratados con IAP

		Antes de la acción del estimulante	Después de la acción del estimulante
5.			
	Grupo de control	$6 \pm 1$	$20 \pm 9$
10.	Glucosa (5 minutos después de inyección intravenosa)		
	Grupo tratado	$7 \pm 1$	$89 \pm 36$
	Grupo de control	$8 \pm 1$	$8 \pm 1$
15.	Epinefrina (5 minutos después de inyección intravenosa)		
	Grupo tratado	$18 \pm 6$	$225 \pm 28$

20. Nota:  $\mu\text{U/ml}$  medio  $\pm$  SE de tres animales en los casos correspondientes.

-4. Actividad mejoradora de tolerancia de glucosa

- Se suministró glucosa por vía oral a ratas y perros y se midió la atenuación del nivel de glucosa en la sangre y el nivel de concentración de insulina en la sangre después de la glucosa para determinar la tolerancia de ésta. La glucosa se suministró a las ratas según una dosis de 0,5 g/100 de peso corporal (ratas) y a los perros según una dosis de 15 g/perro después de 18 a 20 horas, de ayuno.
10. En los grupos de ratas y perros tratados con IAP, se suprimió de modo sensible la elevación de nivel de glucosa en la sangre mientras que se presentó un evidente aumento de concentración de insulina en la sangre, pero la concentración de insulina se redujo rápidamente al nivel anterior a la alimentación de glucosa en correspondencia con la normalización del nivel de glucosa en la sangre y no se observó ninguna disminución del nivel de glucosa en la sangre debido a secreción excesiva de la insulina (tablas 10 y 11). Estos resultados manifiestan una mejora sensible de la tolerancia de glucosa en los animales tratados con IAP.
- 15.
- 20.

Tabla 10

Cambios en la concentración de glucosa en la sangre e insulina en el plasma de perros después de la alimentación de glucosa.

5.		<hr/>						
Tiempo después de la alimentación de glucosa (minutos)		0	15	30	60	90	120	180
<hr/>		<hr/>						
10. Glucosa en la sangre (mg/dl)								
grupo de control		125±9	177±14	123±9	118±4	111±9	113±13	109±1
Grupo tratado		97±3	117±9	108±7	118±4	96±6	88±8	97±3
15.		<hr/>						
Insulina en el plasma (µU/ml)								
20. Grupo de control		3±2	17±2	23±15	8±2	12±2	8±3	8±1
Grupo tratado		9±5	63±10	16±6	20±2	12±4	9±1	10±1
		<hr/>						

El grupo tratado recibió inyección intravenosa de 1 µg (proteína) de IAP/kg 3 días antes del experimento.

25. Valor media ± SE de cuatro animales en los casos correspondientes.

Tabla 11

Cambios en las concentraciones de glucosa en la sangre e insulina en el plasma de ratones después de la alimentación de glucosa.

5.

---

Tiempo después de la alimentación de glucosa (minutos)	0	30	60	90	120	180
--	---	----	----	----	-----	-----

---

10.	Grupo de control	68±1	102±9	98±3	108±4	114±4	120±4
	Grupo tratado	51±1	72±6	54±2	48±5	62±6	69±7

---

15.	Grupo de control	19±2	47±6	38±4	41±2	41±5	55±5
	Grupo tratado	25±4	126±9	79±10	61±6	69±7	104±18

---

El grupo tratado recibió inyección intravenosa de 0,5 µg de IAP 3 días antes de este experimento.

20. Valor: medio ± SE de 5 animales en los casos correspondientes.

-5. Recuperación de diabetes producida por estreptozotocina por pretratamiento con IAP.

25. Es sabido que la acción de la estreptozotocina (la cual se hará referencia a continuación con la sigla STZ) induce la diabetes en los animales experimentales destruyendo de modo notable las células B de la isla de Langerhans.

Sin embargo se encontró que en ratas tratadas con IAP, la diabetes inducida por STZ se curó prontamente y la glucosa en la sangre y la tolerancia de la sangre en estado de no ayunas, se normalizaron.

5. Este experimento se llevó a cabo en un método tal que las ratas recibieron primeramente la acción de 1 µg de IAP y a continuación STZ (5 mg/100 g por inyección intravenosa) 3 - 5 días más tarde. Después de 24 horas de la acción de STZ, se observó hiperglicemia tanto en el grupo de control como en el grupo tratado, sin embargo en el grupo tratado la glucosa en la sangre alcanzó el área normal en los días quinto y sexto gradualmente después de la acción del STZ y la concentración de la insulina en el plasma fue de modo significativo más alta que en el grupo de control (Tabla 12).

A continuación, en el séptimo día después de la acción de STZ, se llevó a cabo el experimento de alimentación de glucosa y se estudió también la tolerancia de glucosa (Tabla 13).

20. Si estas ratas se encontraban en ayunas, la concentración de glucosa en la sangre se hacía la misma aparentemente tanto en el grupo de control (en el que se había tenido solamente la acción de STZ) y los grupos tratados con IAP, sin embargo, el deterioro de la tolerancia de glucosa, se observó de modo claro en los grupos de control en comparación con el grupo normal.

Por otra parte, en el grupo tratado, la tolerancia de glucosa se mejoró en un grado tal comparable al del grupo

normal y la insulina del plasma en respuesta a la alimentación de glucosa fue más alta que la del grupo de control. Por estos descubrimientos se puede considerar que la diabetes inducida por STZ, se cura en los animales pretratados

5. con IAP.

Tabla 12

Recuperación de la diabetes producida  
por estreptozotocina con pretratamiento  
mediante IAP

10.

Número de días después de la acción de STZ	0	2	3	5	7
--	---	---	---	---	---

15.

Grupo de control Glucosa en la sangre (mg/dl)	94±3	375±20	360±16	355±8	352±4
---	------	--------	--------	-------	-------

Insulina en el plasma (μU/ml)	20±2	30±3	26±4	-	24±2
----------------------------------	------	------	------	---	------

20.

Grupo tratado Glucosa en la sangre (mg/dl)	98±2	358±19	250±35	199±41	145±22
--	------	--------	--------	--------	--------

Insulina en el plasma (μU/ml)	63±5	69±5	54±6	-	62±4
----------------------------------	------	------	------	---	------

25.

Valor medio ± SE de 5 animales en los casos correspondientes.

Tabla 13

Mejora de la tolerancia de glucosa en diabetes  
por estreptozotocina por tratamiento con IAP

5.	Tiempo después de la alimenta- ción de glucosa (minutos)	0	15	30	60	90
		Grupo de control	83±7* (18±2)**	214±18 (22±5)	291±27	327±23
10.	Grupo tratado	82±6 (24±2)	159±16 (49±2)	177±14	173±10	141±13
	Grupo normal	82±3 (17±1)	130±11 (43±4)	161±5	155±4	138±7

15.

\* Glucosa en la sangre (mg/dl)

\*\* Insulina en el plasma (µU/ml)

Valor medio ± SE de 5 animales en los casos respectivos.

20.

-6. Mejora de la tolerancia de la glucosa por la administración IAP a ratones diabéticos de modo espontáneo (ratones (KK) similar a la diabetes humana.

25. Los ratones KK se consideran el modelo de animal de patosis similar a la diabetes de los seres humanos, puesto que los ratones adquieren diabetes espontánea en el envejecimiento, por causas hereditarias y por factores

ambientales como coadyuvantes. Por lo tanto el que se tenga un efecto terapéutico eficaz del IAP en estos animales constituirá un índice muy importante en la analogía del caso de los seres humanos a partir de los resultados conseguidos por el experimento humano. Consiguientemente se llevó a cabo el siguiente experimento. Los ratones utilizados para este experimento fueron ratones KK que originalmente fueron suministrados por la Facultad de Agricultura de la Universidad de Nagoya, en los cuales se continuó el apareamiento y cría entre hermanos y hermanas. El experimento fue llevado a cabo del modo siguiente. La glucosa fue suministrada de modo oral (0,15 g/20g de peso corporal) a los ratones con edades de 20-25 semanas, a continuación se seleccionaron 5 animales que mostraron un definido deterioro de tolerancia de la glucosa en comparación con el grupo normal (tipo ddy). Tal como se muestra en la figura 14, no se observó la desaparición de la glucosa después de la alimentación de glucosa en estos ratones y éstos se consideran evidentemente en estado diabético. A este grupo KK, se le suministró nuevamente glucosa al tercer día después de la inyección de la sustancia actual considerada en esta Patente, en la vena de cola. Como resultado, la tolerancia de glucosa aumentó grandemente en comparación con el estado en que se encontraban antes de la administración de esta sustancia. Además la tolerancia de glucosa se mejoró mucho más que la del grupo normal. Como consecuencia se puede considerar que la administración del IAP resulta en un efecto terapéu-

tico satisfactorio en diabetes espontánea.

Tabla 14

Mejora de la tolerancia de glucosa  
en ratones KK por tratamiento de

5.

IAP

		0	30	60	120	180
	Tiempo después de la alimentación de glucosa (minutos)					
10.	Grupo					
	Grupo normal (tipo ddy)	98±7*	214±16	339±13	192±9	144±14
	Grupo diabético (grupo KK)					
15.	Antes del tratamiento	117±6	300±33	308±21	326±40	310±39
	Después del tratamiento	72±3	150±11	118±9	90±8	63±11

20. Valor medio ± SE de 5 animales en los casos correspondientes.

\*Glucosa en la sangre. (mg/dl)

-7. Duración de la acción farmacológica

25. La actividad farmacológica del IAP se manifiesta varias horas después de la administración, alcanzando los niveles más elevados en un período de 3 a 7 días y luego gradualmente disminuye. A continuación se muestran resultados de experimentos de duración de actividades en ratas

(0,5 µg) y perros (1,0 µg/kg).

En los perros, las investigaciones se llevaron a cabo en cuanto a tolerancia de glucosa en respuesta a la alimentación de glucosa por inyección intravenosa al 15º día después de la administración de IAP y también en las actividades de secreción de insulina como respuesta a la epinefrina y glucagón en los días 29º y 42º respectivamente después de la administración de IAP. Como resultado, se observó todavía una actividad suficiente en día 42º (Tabla 15). En las ratas, aproximadamente el 50% de la actividad en el máximo (3 días después de la administración) se observó al día 28º después de la administración.

Se puede juzgar de estos resultados que las actividades farmacológicas del IAP se mantienen durante varias semanas e incluso hasta varios meses si bien el vigor de dichas actividades es incierto en razones del dosado.

Tabla 15

Aumento de secreción de insulina en perros por acción de glucagón en el día 42 después de la administración de IAP

5.	Tiempo después de la acción de glucagón (minutos)	0	5	15	30
	Grupo de control	6±1*	14±1	9±2	8±1
	Grupo tratado	6±1	71±9	28±8	7±1

10.

Inyección intravenosa con 25 µg/kg de glucagón  
 Valor medio ± SE de 5 animales en casos respectivos

\* µU/ml.

-8. Dosado efectivo y ruta de administración

15. La dosis efectiva de IAP para aplicación humana es de 10 ng/kg (peso corporal) - 1 µg/kg (peso corporal) en caso de la muestra pura. Sin embargo es posible también administrar una dosis tan elevada como 2 µg/kg (peso corporal) e incluso superiores, de una sola vez.

20. El método más efectivo de administración es la inyección intravenosa, sin embargo se pueden llevar a cabo también otros modos de administración.

-9. Estabilidad de la actividad

Estabilidad térmica

25. Método del experimento:

La solución de muestra (40 µg proteína/ml, pH 7,0) se sometió a varias temperaturas desde 37°C a 100°C duran-

te 15 minutos y se estudiaron los cambios en la actividad promotora de secreción de insulina. Como control, la muestra mantenida 4°C se utilizó y se mostró la indicación de actividad por la actividad relativa con una muestra a 5. 4°C como 100 (Tabla 16).

Tabla 16

	Temperatura (°C)	Actividad relativa
10.	4	100
	37	100
	56	113
	60	76
15.	70	53
	80	18
	100	13

20. A pesar de que el área de estabilidad térmica del IAP está por debajo de 56°C, la actividad era todavía observable en la solución sometida a 80°C.

Estabilidad al pH

25. La solución de 40 µg proteína/ml recibió la añadidura de 3 N HCl o 3 N NaOH para ajustar el pH y se almacenó a 4°C durante 24 horas. A continuación la solución resultante se suministró a los animales después de devolver su pH próximo al carácter neutro y se estudiaron los

cambios en la actividad promotora de secreción de insulina. Los resultados se indican por las actividades relativas con el pH 7,0 como 100 en la Tabla 17.

Tabla 17

5.

	pH	Actividad relativa
	1	16
10.	2	27
	3	43
	4	112
	7	100
	9	120
15.	10	89
	11	23
	12	0

20. Si bien el área estable se encuentra de pH 4 a 9, la actividad permaneció todavía en soluciones de pH menor que 3 y también en las de pH 10 y 11.

-10. Toxicidad aguda

25. Lo siguiente muestra la toxicidad aguda LD50 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal) de una muestra purificada de IAP cuando los ratones de tipo ddy se utilizaron como animales de experimento.

animales ddy

	♂	♀
inyección subcutánea	540	580
inyección intravenosa	222	155

5.

-11. Aplicaciones farmacéuticas

Tal como se ha descrito en detalle anteriormente, las sustancias proteínicas objeto de esta invención son muy útiles como remedio y preventivo para la diabetes. La dosis efectiva para aplicaciones humanas varía dependiendo de la actividad específica de la totalidad de la sustancia. Usualmente, para su uso en la promoción de secreción de insulina se administran dentro de la escala 10ng/kg (peso corporal) hasta varias decenas µg/kg (peso corporal).

10.  
15.

En cuanto al modo de administración al paciente, la inyección intravenosa es el más efectivo en cualquier utilización pero también se pueden utilizar otros modos de administración tales como inyección intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, administración directa en los órganos digestivos o administración oral, intrarrectal, sublingual, nasal mucosal, intraarterial, intralinfagial, o intratraqueal.

20.

En lo que respecta a la forma de administración, se pueden citar inyectables, supositorios, recubrimientos entéricos y gástricos, tabletas sublinguales e inhalacio-

25.

nes. Un modo muy simple de inyección consiste en un compuesto de 1 ml de mezcla de 10.000 unidades de sustancia activa en la secreción de la insulina, 9 mg de NaCl y agua destilada esteril.

5. Quedará evidente a los conocedores de esta técnica que se pueden mezclar otros aditivos que no tengan posibilidad de afectar la actividad de las sustancias activas, en la preparación de los medicamentos.

10. Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A

Se reivindica como objeto de esta Patente de invención:

- 1.- Procedimiento para la preparación de compuestos promotores de secreción de insulina, caracterizado por proceder al cultivo del microorganismo *Bordetella* consiguiendo una proteína activadora de los islotes (islets) y que tiene una acción promotora de la secreción de la insulina así como una acción mejoradora de la tolerancia a la glucosa a los mamíferos, poseyendo un peso molecular de  $77.000 \pm 6.400$  determinado por filtración de gel y cuya composición comprende un contenido de proteínas determinado por el método Lowry superior a 95% de peso y un contenido de glúcidos por el método de phenol- $H_2SO_4$  de aproximadamente 1% en peso y siendo el contenido de lípidos menor que el límite de detección, y comprendiendo los aminoácidos componentes de la fracción proteínica (proporción promedio  $\mu M/100 \mu M$ ): ácido aspártico 7,5; treonina 7,3; serina 6,4; ácido glutámico 10,0; prolina 5,8; glicina 8,8; alanina 9,3; cistina/2, 2,5; valina 6,5, metionina 2,8; isoleucina 4,0; leucina 7,8; tirosina 6,5; fenilalanina 3,7; lisina 3,3; histidina 1,5 y arginina 6,4, con un pH isoeléctrico  $8,4 \pm 0,5$ , y una disposición electroforética de disco en la que la acrilamida (concentración de poliacrilamidas 7,5%; equilibrador (pH 4,3) 1N KOH- ácido acético glacial) proporcionando la electroforesis de disco de dicha sustancia una banda única muy definida en el lado catódico.



2.- Procedimiento para la preparación de compuestos promotores de secreción de insulina, según la reivindicación anterior, que comprende el cultivo de una cepa adecuada del microorganismo Bordetella Pertussis en un cultivo adecuado y recuperando la proteína activadora de los islotes (islets) de la reivindicación anterior o equivalente del mismo, a partir del cultivo mediante cualquier método corrientemente empleado en esta técnica.

5. 3.- Procedimiento para la preparación de compuestos promotores de secreción de insulina, según las reivindicaciones caracterizado por proceder a la aplicación del preparado proteínico activo según la reivindicación 2 en forma de ingrediente activo y portador farmacéuticamente aceptable.

10. Sean cuales fueren las circunstancias que concurran en la esencialidad de la Patente de invención definida en las anteriores reivindicaciones, cuyo objeto es:

15. 4.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS PROMOTORES DE SECRECIÓN DE INSULINA".

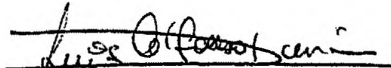
20. Consta la presente memoria de cincuenta y cinco hojas foliadas, mecanografiadas por una sola cara y de los dibujos unidos a la misma.

Barcelona, 1 FEB. 1978

P.A. de KAKENYAKU KAKO KABUSHIKI KAISHA.

ALFONSO DURÁN

p. p.

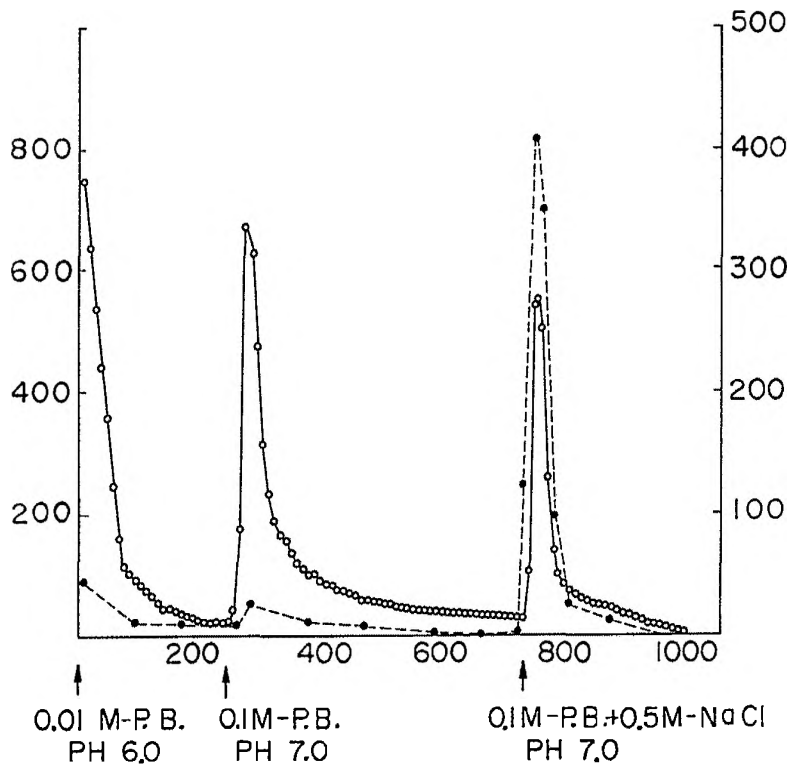


JR/mp

Fdos. Luls A. Durán Moya



# FIG. 1



BARCELONA, - 1 FEB. 1978  
P.A. ALFONSO DURÁN

P.P.

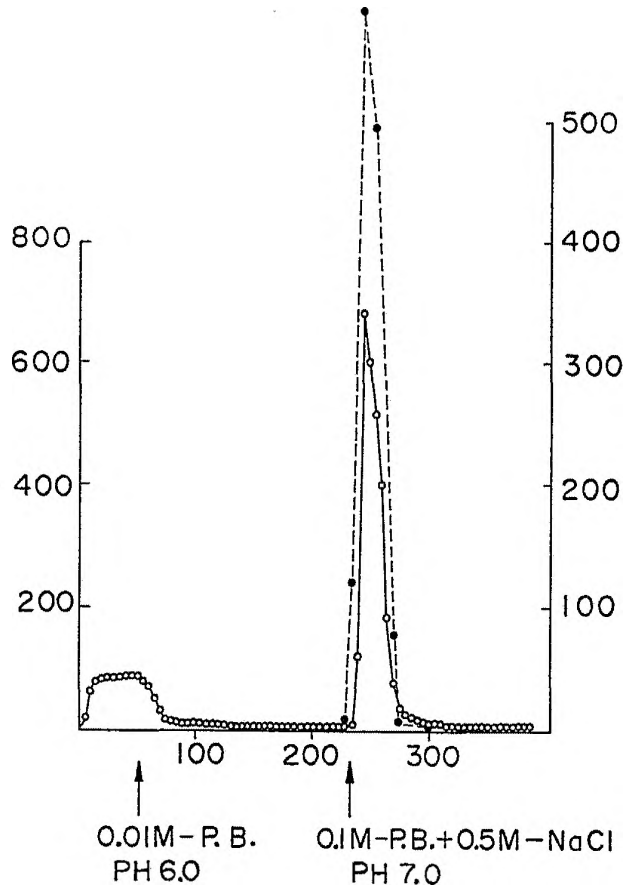
ESCALA VARIABLE

A.P.  
(78)

KAKENYAKU KAKO KABUSHIKI KAISHA

4 HOJAS  
HOJA Nº 2

FIG. 2

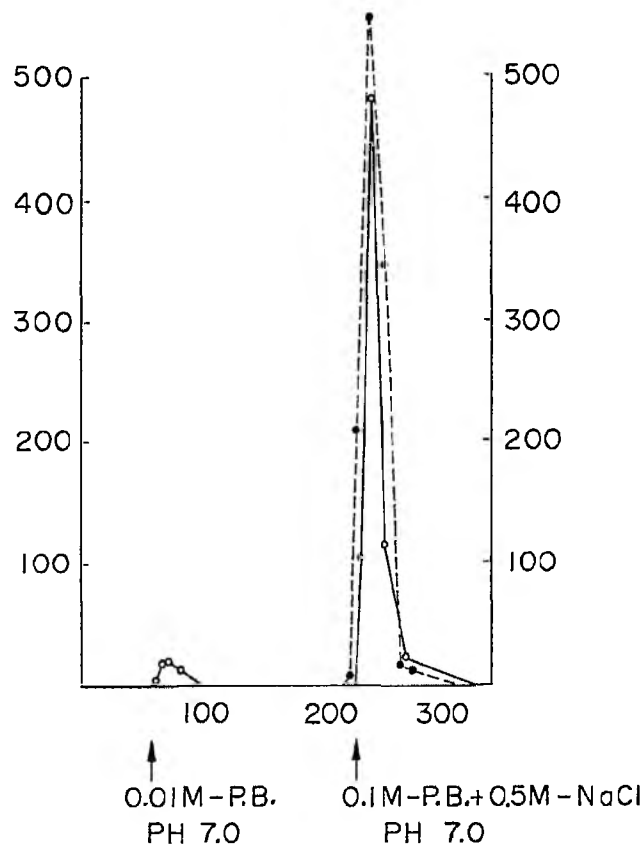


ESCALA VARIABLE

BARCELONA, - 1 FEB. 1978  
P.A. ALFONSO DURAN

*Alfonso Duran*

# FIG. 3



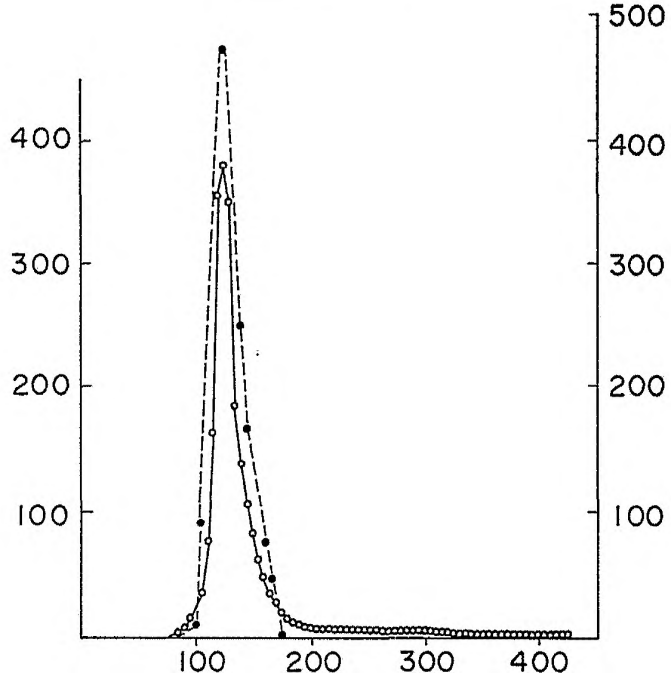
BARCELONA, - 1 FEB. 1978  
P.A. ALFONSO DURÁN

p. p.

*[Handwritten signature]*

ESCALA VARIABLE

**FIG. 4**

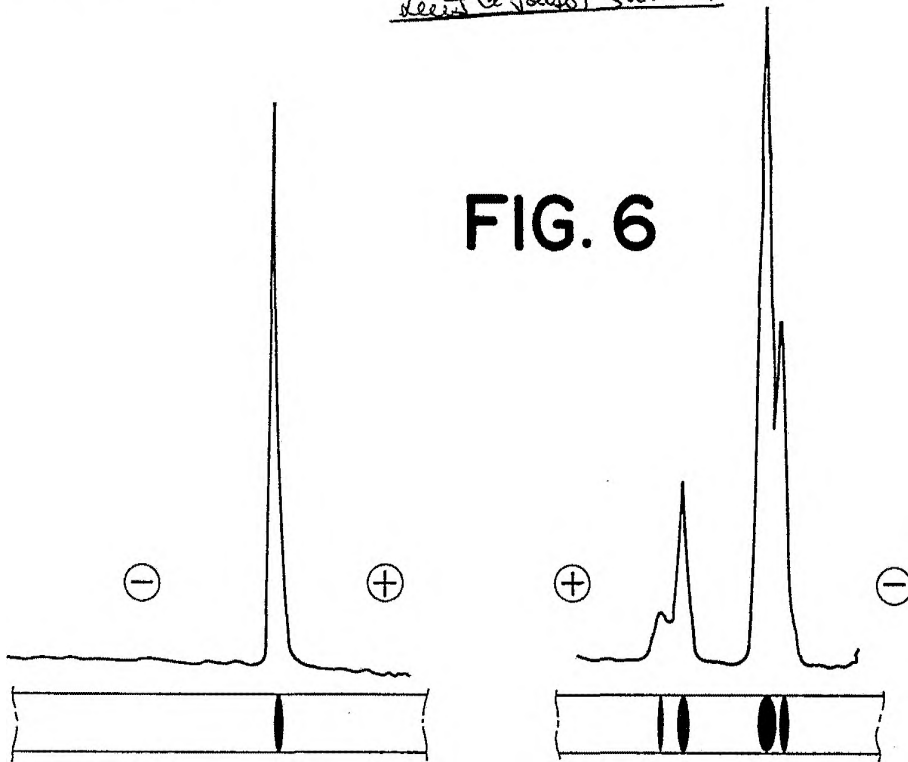


BARCELONA, - 1 FEB. 1978  
P.A. ALFONSO DURAN

P. P.  
*de Alfonso Duran*

**FIG. 5**

**FIG. 6**



ESCALA VARIABLE