

25 ABR. 1963

P. 24.161.-

15/25/37/2096
Zymosan/R-Factor 5



285152

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 15 de Febrero de 1963, con el núm. 285.152

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de NYEGAARD & CO. A/S., entidad noruega, establecida en Nycoveien, Oslo, Noruega, por:

"UN METODO DE PRODUCIR UN MATERIAL POLIPEPTIDO"

=====

Este invento se refiere a la producción de una sustancia para empleo en medicina con el fin de aumentar la resistencia a la infección.

5 Se ha demostrado que los preparados derivados de levadura poseen actividad, por inyección parenteral, para estimular la resistencia humana a la infección, habiéndose realizado muchas investigaciones sobre la acción anticomplementaria de los preparados de pared celular de levadura en unión con la proteína properdina. El preparado zimosan, que es un
10 producto de pared celular de levadura, insoluble en agua,



prácticamente libre de proteína y carbohidrato, es el principal material activo de esta clase. Se ha demostrado que la actividad protectora del producto es debida principalmente a efectos tales como estimulación de fagocitosis y acción antigénica. El producto en cuestión es una mezcla compleja de lípidos, proteínas, polisacáridos, etc, y ejerce un efecto pirogénico por inyección. Como consecuencia de los efectos pirogénicos y antigénicos, este producto tiene considerables inconvenientes para empleo en medicina.

5
10 Hemos encontrado ahora que puede aislarse un factor de material de pared celular fúngico que, al mismo tiempo que ejerce una acción protectora no específica contra la infección, es acuosoluble, no pirogénico y no antigénico. Dicho nuevo factor puede emplearse, pues, en medicina para comunicar in-
15 munidad no específica sin inducir efectos indeseables de ninguna clase.

De acuerdo con el presente invento, proporcionamos un método para la producción de un material polipéptido prácticamente no antigénico, y no pirogénico, que tiene una acción
20 de inmunidad no específica, que comprende las operaciones de digerir material de pared celular fúngico insoluble en agua, con ácidos o álcalis, para producir una fracción acuosoluble que se separa luego del material insoluble en agua, y recuperar el material polipéptido no antigénico, no pirogénico
25 mencionado, de dicha fracción.

Desde el punto de vista químico, como se ha indicado arriba, el producto es un polipéptido o mezcla de polipéptidos, empleándose este término en un sentido amplio para definir sustancias que tienen una estructura polipéptida básica,
30 independientemente de que haya presentes también otros



grupos tales como carbohidratos.

El material de pared celular fúngico empleado como material de partida conviene que sea levadura o una sustancia derivada de levadura, ya que este material de productos especialmente efectivos, pero pueden emplearse también otros hongos, p. ej. penicilina, streptomices, etc.

El factor activo está en una forma insoluble cuando se encuentra en la célula fúngica, siendo conveniente, como operación preliminar, tratar las células, después de lisis, para eliminar proteínas, carbohidratos acuosolubles, etc., p.ej. lavando con agua. También es conveniente tratar el material de pared celular con un enzima proteolítico p.ej. tripsina, papaína, etc., antes de lavar con agua, con el fin de eliminar el material proteínico insoluble eventual. Otra operación de purificación que puede realizarse convenientemente antes de la digestión de acuerdo con el invento es el lavado con un alcohol, p.ej. etanol, metanol, etc., preferiblemente etanol acuoso de 95%.

Un material de partida de pared celular especialmente preferido es la sustancia comúnmente denominada zimosan. Este término se aplica a preparados de pared celular de levadura purificados que se caracterizan principalmente por estar prácticamente libre de proteínas y carbohidratos de naturaleza acuosoluble.

La mayoría de las formas de zimosan se preparan sometiendo levadura, por ejemplo levadura de panadería de Fleischmann; a lisis, p.ej. empleando fosfato disódico acuoso hirviendo, e incubando luego los residuos celulares insolubles con una enzima proteolítico tal como tripsina, generalmente en presencia de tolueno. La incubación se realiza nor-

285152



malmente durante un período de tiempo prolongado, p. ej. unos
16 días a 37°C. El material se lava luego bien con agua ca-
liente y finalmente con etanol de 95%. La preparación de zi-
mosan está descrita, por ejemplo en J. Exp. Medicine, 103,
5 (1956), 1, por Pillemer y col.

Cuando se emplea una sustancia ácida para digerir el
material de pared celular en el procedimiento presente, es
preferiblemente un compuesto débilmente ácido p.ej. un áci-
do alifático, tal como ácido acético, propiónico, etc. o me-
10 jor un fenol, por ejemplo un monohidroxibenceno o dihidroxi-
benceno. Se prefiere fenol de 90 a 100%.

Se ha encontrado que, cuando se usan fenoles para la
digestión, el producto suele ser insoluble en ácidos, estan-
do en una forma de peso molecular particularmente elevado.
15 Cuando se emplean para la digestión otros ácidos, el polipép-
tido liberado es pues, insoluble hasta que el ácido se neu-
traliza o hasta que se ha producido la degradación a formas
de peso molecular menor. Entre las sustancias alcalinas que
pueden emplearse para la digestión estén, por ejemplo, los
20 hidróxidos acuosos diluidos de metal alcalino o amonio, car-
bonatos, etc, p.ej. hidróxido sódico, siendo una dilución con-
veniente la de 0,05-0,5 N.

El factor activo acuosoluble puede separarse en solu-
ción del material de pared celular insoluble en agua residual,
25 por ejemplo, por centrifugación, filtración, etc. y si se de-
sea, puede aislarse el factor sólido, p. ej., por evaporación,
liofilización, precipitación, etc. Cuando el extractante es
fenol, el factor activo conviene precipitarle con un disol-
vente no polar, p. ej. un éter, hidrocarburo, etc. preferi-
blemente éter dietílico. Conviene añadir la solución fenólica
30

285152



5
10
15
20
25
30

a una mezcla difásica de éter dietílico y agua, con lo cual se forma un precipitado en la fase acuosa. Si se desea, puede purificarse éste añadiendo hidróxido amónico para disolver el precipitado, extrayendo con un disolvente inmiscible, tal como éter, para eliminar indicios de fenol y liofilizando para aislar el factor activo.

Si se desea, el factor acuoso soluble puede someterse a uno o más tratamientos subsiguientes para efectuar una nueva purificación. Así, por ejemplo, puede eliminarse material de peso molecular más bajo mediante técnicas de tamiz molecular, p. ej. por diálisis, ultrafiltración, etc. o, convenientemente, por tratamiento con materiales de tamiz molecular, preferiblemente en forma de partículas, p.ej. el derivado de dextrano de enlace cruzado de óxido de etileno, Sephadex G50 (que se vende por la firma A.B. Pharmacia de Uppsala, Suecia), cuando el material de bajo peso molecular es absorbido sobre las partículas y el factor activo queda sin absorber. El material de tamiz molecular es preferiblemente no permeable a sustancias de peso molecular mayor de 1000, convenientemente mayor de 8000. Así, por ejemplo, puede hacerse pasar una solución acuosa del factor activo a través de una columna de dextrano de enlace cruzado, estando constituida la primera fracción que hay que lavar por el factor activo deseado, quedando retenido en la columna el material de peso molecular menor. En este procedimiento, el factor activo puede lavarse a través de la columna con una solución alcalina diluida, p.ej. álcali acuoso 0,05-0,5 N tal como sosa cáustica 0,1 N. Convenientemente, se pone en contacto el dextrano de enlace cruzado con una solución acuosa de una sal de metal alcalino antes del fraccionamiento y se separan los aniones lavan-

285152



do. Es conveniente que haya presente un electrolito en la solución que se quiere tratar, ventajosamente la misma sal que se pone en contacto con la columna.

5 El material activo es de caracter ácido y, si se desea, puede adsorberse sobre un material de cambio iónico celulósico débilmente básico, por ejemplo, del tipo descrito por Peterson & Sober J.A.C.S., 751,(1956), es decir, una celulosa químicamente modificada de manera que lleve uno o más grupos amino, grupos dialcoholamino, o grupos dialcoholaminoalcoholo, p.ej. dimetilaminoetilcelulosa o el producto de reacción de epíclorhidrina, trietanolamina y celulosa sódica, lavando después hasta que queda libre de impurezas no adsorbidas y eluyendo luego. El eluyente conviene que sea un electrolito acuoso, por ejemplo, una solución acuosa débilmente 10 alcalina p.ej. hidróxido o carbonato de metal alcalino o amonio acuoso diluido, p.ej. a concentración 0,05- 2N, o una solución neutra que contenga una o más sales p.ej. un haluro de metal alcalino tal como cloruro sódico en una solución amortiguada a pH 7, p.ej. amortiguador de fosfato. Es conveniente que el material de cambio iónico esté amortiguado a 20 un pH comprendido entre 6 y 10, preferiblemente, entre 6,5 y 8,5 y que la solución que se ha de tratar esté amortiguada al mismo pH. La concentración de sólidos en la solución conviene que esté comprendida entre 1 y 2% en peso.

25 Otro tratamiento de purificación que puede emplearse ventajosamente es la adsorción del factor activo sobre una sustancia que adsorbe selectivamente material de alto peso molecular, p.ej. un silicato complejo tal como amianto, bentonita, celita, montmorillonita, etc., seguido, después de 30 lavar hasta eliminar las impurezas de bajo peso molecular, de

285152



elucción. Como adsorbente se prefiere el amianto, por ser especialmente efectivo, permitiendo adsorber el factor activo a pH neutro p.ej. 4 a 7, preferiblemente 5-6, y eluirle con líquidos básicos, p.ej. carbonatos o hidróxidos de amonio o de metal alcalino acuosos diluidos, o fenoles, por ejemplo el fenol mismo. El eluyente puede ser también una solución de alta concentración electrolítica, p.ej. cloruro sódico acuoso. Otro tratamiento de purificación que puede emplearse es la adición de un precipitante de proteínas inertes sobre una solución acuosa del material polipéptido para separarle del extracto acuoso.

El precipitante de proteínas puede añadirse como sustancia sólida, tal como una sustancia inorgánica acuosoluble, por ejemplo, una sal tal como sulfato amónico, cloruro amónico, etc., o ácido fosfotúngstico o, puede ser un líquido, por ejemplo, una solución concentrada de dichas sustancias.

El material de alto peso molecular que contiene la sustancia polipéptida puede precipitarse del extracto acuoso y separarse, por ejemplo, por filtración, centrifugación, etc, o puede hacerse que se disuelva en una fase orgánica separada. La fase orgánica puede ser un líquido inmisible con agua, o preferiblemente un líquido polar que es normalmente miscible con agua, pero forma una fase separada cuando la fase acuosa contiene grandes cantidades de material disuelto, como sucede cuando el precipitante es una sal inorgánica. Tales disolventes polares tienen una mayor solubilidad para el factor que los disolventes no polares.

Según un modo de poner en práctica este procedimiento, el precipitante proteínico se añade sobre una solución acuosa que contiene el factor activo y un disolvente miscible con



agua, con lo cual se forman dos fases, separándose la fase orgánica y recuperándose de la misma el material activo.

5 En general, el pH del extracto acuoso influirá sobre la separación, y la cantidad de precipitante ha de estar en relación con el pH. La presencia de otras sustancias disueltas, por ejemplo, líquidos orgánicos miscibles con agua, tales como etanol, acetona, etc, influye también en la concentración de precipitante que da resultados óptimos.

10 En general, cuando se usa sulfato amónico como precipitante, la concentración óptima de la sal está comprendida entre 25 y 60 % de saturación, estando el pH comprendido preferiblemente entre los límites de 5 y 8. Cuando se emplea también un producto orgánico miscible con agua, p.ej. etanol, conviene que la cantidad del mismo esté comprendida entre 30 y 15 60 % de la fase acuosa, eligiéndose las proporciones exactas de sulfato amónico y líquido miscible con agua de manera que den lugar a dos fases. Por ejemplo, si se emplea una concentración de 46 % de etanol, la concentración de sulfato amónico puede ser 25 % en peso.

20 La cantidad de líquido orgánico añadida se calcula preferiblemente para que dé un volumen relativamente pequeño en la fase separada, de manera que se origine una concentración del factor activo. Hay que advertir que, cuando se añade etanol, precipita normalmente algo de material indeseable y puede tirarse antes de fraccionar con una sal inorgánica.

25 La adición de precipitante se efectúa preferiblemente a temperatura ambiente y las concentraciones preferidas de precipitante arriba indicadas no siempre son aplicables a temperaturas mayores. Sin embargo, el polipéptido es estable hasta 30 90°C y podrían usarse temperaturas mayores sin que se origine inactivación.



El material activo preparado por el procedimiento de acuerdo con el invento es una sustancia nueva y constituye una característica más del invento. Puede caracterizarse por su solubilidad en agua, especialmente en álcali diluido, dando una fluorescencia verde-amarilla, por su carácter ácido, y, más especialmente, por poseer actividad protectora contra infecciones al mismo tiempo que carece prácticamente de actividad pirogénica y antigénica. El factor activo es un material polipéptido compuesto de un número relativamente pequeño de aminoácidos, es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, glicina, serina, prolina, alanina, valina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina e isoleucina. Están ausentes metionina y cisteína. El producto da positiva la reacción del biuret sobre una base de peso seco 80-90 % del de la albúmina. Tiene un contenido de nitrógeno de 12% y contiene aproximadamente 2 % de hexosa, según se determina por el método de la antrona. Se colorea con el amido-Schwarz (reactivo que da color con las proteínas). La electroforesis en papel con amortiguador de veronal a pH 8,7 demuestra que está cargado negativamente. Es termoestable hasta 100°C. A diferencia de otros materiales que, por lo demás, son parecidos, preparados a partir de hígado y sangre según se describe en nuestra solicitud número 283.674, el material obtenido por extracción fenólica de zimosan, precipita en solución ácida. Por consiguiente, precipita con ácido sulfosalicílico. Sin embargo, el material obtenido por extracción fenólica de micelio de penicilina parece que es soluble en ácido acuoso y no precipita por ácido sulfosalicílico. Sin embargo, la totalidad del material precipita por ácido fosfotúngstico y por sulfato amónico a semi-saturación, como



se ha indicado arriba.

Las propiedades biológicas de las nuevas sustancias son las siguientes:

Inhibición de mitosis. Este material impedirá la mitosis de células Hela cuando se desarrollen en un medio de Puck a una concentración de 0,75 mg/ml. Una cantidad de 0,33 mg/ml. producirá 50% de inhibición.

Protección contra virus de vacuna

(a) Embrión de pollo

10 Cantidad de material administrado a embriones de pollo:

3,3/ug

Vivos	Muertos	Reacción sobre membrana corio-alantoica,marca	Vivos	Muertos	Reacción sobre membrana corioalantoica,marca
70	50	108	26	82	260
70 vivos de 120			26 vivos de 108		

(b) Piel de conejo

Cantidad de material inyectado en la piel de conejo	Grado de reacción en la piel de conejo.
22/ug	+++
40/ug	++
66/ug	++
200/ug	+
Control	++++

Protección contra infección de E.coli en ratones

Dosis de desafío bacterial: $1,25 \times 10^8$ organismos por ratón.

30 Se inyecta 0,2 mg. de material intraperitonealmente antes del

2000



desafío.

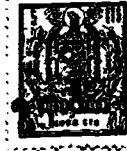
Supervivientes/ total ratones

Material inyectado 24 horas antes del desafío	6/18
Material inyectado 6 horas antes del desafío	5/18
Control	0/18

10 Toxicidad. Se inyectaron 10 mg. por vía intravenosa en cada uno de cuatro conejos sin ningún síntoma tóxico.

15 Como se ha indicado arriba, el producto es prácticamente no pirógeno y no presenta sustancialmente ninguna actividad antigénica. Por inyección, induce inmunidad contra virus de vacuna, E. coli y un número considerable de otras bacterias y virus, habiéndose encontrado que es efectivo para inducir resistencia a virus del catarro común, p. ej. por rociado directo en la mucosa nasal.

20 Este nuevo producto de acuerdo con el invento puede formularse para administración en unión con uno o más excipientes farmacéuticos. La naturaleza del excipiente o excipientes dependerá del tipo de preparación que se desee. Las composiciones pueden tomar convenientemente la forma de unidades de dosificación, cada una de las cuales contiene convenientemente de 5 a 20 mg. del polipéptido activo. En términos generales, 25 pueden formularse preparados para administración parenteral, en cuyo caso el excipiente será un líquido aceptable, desde el punto de vista parenteral, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógeno, o para administración oral, en cuyo caso, los excipientes pueden contener agua, junto con uno o más de los agentes 30 saporíferos, de conservación, dispersantes, colorantes,



edulcorantes, etc. Los preparados pueden también tomar la forma de preparados sólidos, p. ej. tabletas que contienen el factor activo. En un procedimiento preferido, se liofiliza una solución obtenida en la operación final, se redisuelve en agua estéril exenta de pirógenos y se esteriliza por paso a través de filtros de vidrio sinterizado apropiados.

El factor activo puede formularse también para administración tópica, p. ej. desde solución acuosa como rociado, que puede contener también una sustancia conservadora, tal como etanol, o p-hidroxibenzoato de metilo o de etilo.

La solución de rociado puede contener, por ejemplo, de 0,01 a 10% en peso, preferiblemente, de 0,05 a 0,5% de material activo.

Para que el invento pueda comprenderse mejor se dan los siguientes ejemplos a título ilustrativo únicamente:

Ejemplo 1

a) Se añadieron 0,2 gr. de zimosan (L.Light & Co Ltd., England; de levadura fresca tipo A, Fleischmann) sobre 25 ml. de fenol a 90% y se mantuvo a 37°C. durante 2 días. El material no disuelto se separó por centrifugación y el residuo se lavó con 5 ml. de fenol al 90%. El extracto fenólico se añadió sobre 150 ml. de éter y 150 ml. de agua y se agitó en un embudo de separación. La capa acuosa contenía un precipitado. Se añadió NH_3 2N sobre la capa acuosa y se disolvió casi la totalidad del material que había quedado sin disolver. Para eliminar los indicios de fenol, se hizo una extracción con éter y se secó por congelación, dando 17 mg. de un sólido blanco.

b) El sólido obtenido según a) dió, cuando se inyectó



1953

a 4 conejos (a un nivel de dosis de 0,1 mg/conejo), el siguiente incremento máximo de temperatura: 0,7°C; 0,6°C; 0,9°C; 0,3°C indicando que la sustancia posee una pirogenicidad despreciable.

5 El sólido obtenido de acuerdo con a) no acusa reacción antigénica, según se deduce del ensayo en piel, cuando se administra por inyección a personas a un nivel de dosis de 0,1 mg.

c) Protección contra infección E.coli en ratones.

10 El sólido obtenido de acuerdo con a) acusa protección, como muestran las cifras siguientes.

Dosis de desafío bacterial: $1,25 \times 10^8$ organismos por ratón. 0,016 mg. del sólido inyectados por vía intraperitoneal por ratón. Se dió a un grupo de 6 ratones el sólido 3 horas antes del desafío bacterial, y a otro grupo, 6 horas antes del desafío, sirviendo como controles 6 ratones que recibían sólo el desafío.

Supervivientes/total ratones

	Control	1/6
20	3 horas antes del desafío	5/6
	6 horas antes del desafío	3/6

d) Protección contra virus de vacunas

El sólido obtenido de acuerdo con a) protegía los embriones de polo contra virus de vacunas.

25	<u>Dilución de vacunas</u>	<u>Fracción de fenol recibida de zimosan</u>	<u>Control</u>
	10^{-6}	Algunas colonias separadas; 10 vivas y 2 muertas	numerosas colonias; 10 muertas y 2 vivas

30

255152



Ejemplo 2.

Digestión de zimosan con NaOH

Se agitó 1 gr. de zimosan a temperatura ambiente con 100 ml. de NaOH 0,1 N durante 24 horas. El líquido sobrenadante se neutralizó con HCl 3N a pH 7,5, se concentró en vacío a 20 ml. y se filtró. La solución se colocó en una columna Sephadex (2,8 cm. x 32,5 cm. de diámetro x altura, equilibrada con agua conteniendo 0,3% de tricresol) y la columna se lavó con agua que contenía 0,3% de tricresol. Se recogieron fracciones de 5,8 ml. Se reunieron las 13 primeras fracciones, se concentraron en vacío, se ajustó el pH a 7,5 con NaOH, 0,1N, se filtró la solución y se secó, por congelación. Peso del material incoloro, 55 mg. Daba, en solución, una fluorescencia amarillo-verdosa a la luz ultravioleta.

Ejemplo 3

Extracción de material de residuos de fermentación de penicilina:

Se mezclaron 25 gr. de micelio de penicilina secado con 200 ml. de fenol acuoso al 90% y se dejó a 37°C durante 2 días. Se obtuvieron 90 ml. de líquido sobrenadante por centrifugación, y se añadieron 750 ml. de éter. El precipitado, que pesaba 2,8 gr., se añadió sobre 400 ml. de agua y el pH se ajustó a 8,5, separando después por filtración el material que había quedado sin disolver. Se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta saturación de 60%, se redisolvió el precipitado en agua, se dializó a + 4°C. y se secó por congelación. Rendimiento de material 45 mg. Una solución del material no pudo coagularse por el calor, dio solamente indicios de precipitación con ácido sulfosalicílico al 20%, y no dio precipitado con HCl 0,1N (véase el material obtenido a partir de zimosan).



Ejemplo 4

Solución de rociado nasal

5 Se disolvieron 0,3 gr. de material secado por congelación, preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, en 100 ml. de una solución acuosa que contenía 5% de etanol de 96% y 5% de glicérol.

10 Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Gran Bretaña el 16 de Febrero de 1962, bajo el núm. 6.113/62 prov. y el 4 de Octubre de 1962, bajo el núm. 37.558/62 prov., se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

15 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

20 1º.- Un método de producir un material polipéptido no antígeno, esencialmente no pirógeno que tiene una acción de inmunidad no específica, que comprende las operaciones de digerir material de la pared celular de hongos insolubles en agua con material ácido alcalino para producir una fracción soluble en agua que luego se separa del material insoluble en agua y recuperar dicho material polipéptido, no antígeno, no
25 pirógeno, desde dicha fracción.

2º.- Un método según el punto 1 en el cual el material de la pared celular de hongos se digiere con un mono-odihidroxi benceno.

30 3º.- Un método según el punto 2 en el cual el mate-



rial de la pared celular de hongos se digiere con fenol.

4º.- Un método según el punto 3 en el cual el material de la pared celular de hongos se digiere con fenol del 90 al 100%.

5 5º.- Un método según el punto 1, en el cual el material de la pared celular de hongos se digiere con un ácido carboxílico alifático líquido o con un hidróxido o carbonato de metal alcalino o de amonio.

10 6º.- Un método según el punto 5 en el cual el material de la pared celular de hongos se digiere con hidróxido sódico o potásico 0,05-0,50N.

7º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el material de la pared celular de hongos es levadura o un material derivado de levadura.

15 8º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el material de la pared celular es descompuesto y tratado para separar proteínas acuosolubles e hidratos de carbono antes de la digestión.

20 9º.- Un método según el punto 8 en el cual el material de pared celular es descompuesto y lavado con agua antes de la digestión.

10º.- Un método según el punto 9 en el cual el material de la pared celular es tratado con un enzima proteolítico antes de lavar con agua.

25 11º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el material de la pared celular es lavado con alcohol líquido antes de la digestión.

12º.- Un método según el punto 11 en el cual el alcohol es etanol acuoso de 95%.

30 13º.- Un método según cualquiera de los puntos ante-



riores en el cual el material de la pared celular se deriva de levadura por descomposición de las células con fosfato disódico acuoso hirviente.

5 14º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual cuando el material de la pared celular es digerido con un fenol, el material polipéptido se precipita por adición de un disolvente no polar.

15º.- Un método según el punto 14 en el cual el disolvente no polar es un eter o hidrocarburo.

10 16º.- Un método según el punto 15 en el cual se añaden eter y agua a la solución de fenol, después de lo cual se forma en la fase acuosa un precipitado del material polipéptido.

15 17º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el material polipéptido se somete a otra purificación después de la etapa de digestión.

18º.- Un método según el punto 17 en el cual el material de polipéptido es precipitado desde solución acuosa por adición de un precipitante inerte de proteínas.

20 19º.- Un método según el punto 18, en el cual el precipitante es un precipitante de sal amónica o es ácido fosfotúngstico.

25 20º.- Un método según el punto 18 o 19 en el cual el material de polipéptido se trata en solución acuosa con un líquido orgánico que forma una fase separada en presencia de concentraciones efectivas del precipitante de las proteínas de manera que, al añadir el precipitante, el polipéptido es obligado a disolverse en dicha fase separada.

30 21º.- Un método según el punto 20 en el cual el líquido orgánico es un disolvente orgánico polar que es miscible



con agua pero inmisible con solución acuosa del precipitante a la concentración efectiva.

22º.- Un método según el punto 21 en el cual el líquido orgánico es etanol.

5 23º.- Un método según cualquiera de los puntos 20 a 22 en el cual el volumen de líquido orgánico es menor que el de la solución acuosa inicial.

10 24º.- Un método según los puntos 18 a 23 en el cual el precipitante es sulfato amónico y se añade para dar una concentración de 25 a 60% en peso.

25º.- Un método según el punto 24 en el cual el pH de la solución es de 5 a 8.

15 26º.- Un método según cualquiera de los puntos anteriores en el cual el extracto acuoso es sometido a dicha purificación por contacto con un adsorbente que sirve para adsorber material de elevado peso molecular a fin de adsorber el material polipéptido activo, seguido por elución con un líquido seleccionado del grupo consistente en líquidos ácidos y básicos y soluciones de elevada concentración de electrolito.

20 27º.- Un método según el punto 26 en el cual el adsorbente es un silicato complejo.

28º.- Un método según el punto 27 en el cual el adsorbente es montmorillonita, bentonita o celita.

25 29º.- Un método según el punto 27 en el cual el adsorbente es amianto.

30º.- Un método según cualquiera de los puntos 26 a 29 en el cual el pH del extracto es de 4 a 7 durante la adsorción.

30 31º.- Un método según el punto 30 en el cual el pH es



de 5 a 6 durante la adsorción.

32º.- Un método según cualquiera de los puntos 26 a 31 en el cual el extracto contiene una elevada concentración de sólidos inmediatamente antes de la adsorción.

5 33º.- Un método según cualquiera de los puntos 26 a 32 en el cual la elución se efectúa con un hidroxi benceno líquido.

34º.- Un método según el punto 33 en el cual el hidroxi benceno es fenol anhidro.

10 35º.- Un método según el punto 33 en el cual el hidroxi benceno es fenol acuoso del 90%.

15 36º.- Un método según cualquiera de los puntos 26 a 32 en el cual la elución se efectúa con una base inorgánica acuosa diluida o con amoníaco o con una solución de cloruro sódico.

20 37º.- Un método según cualquiera de los puntos 17 a 25 en el cual dicha purificación se efectúa poniendo en contacto el extracto acuoso con un material de tamiz molecular impermeable para moléculas de peso molecular mayor de 1000 para separar dichas moléculas de sustancias de menor peso molecular.

38º.- Un método según el punto 37 en el cual el material de tamiz molecular es impermeable para sustancias de peso molecular mayor de 8000.

25 39º.- Un método según los puntos 37 o 38 en el cual el material de tamiz molecular es un dextrano reticulado con óxido de etileno.

40º.- Un método según el punto 39 en el cual el material de tamiz molecular es Sephadex G5C.

30 41º.- Un método según cualquiera de los puntos 37 a

285152



40 en el cual el material de tamiz molecular se usa en forma de partículas.

42º.- Un método según cualquiera de los puntos 39 a 41 en el cual el dextrano raticulado es puesto en contacto con una solución acuosa de una sal de metal alcalino antes del fraccionamiento y los aniones de dicha sal se separan por lavado.

43º.- Un método según el punto 42 en el cual dicha sal es una sal sódica.

44º.- Un método según cualquiera de los puntos 39 a 43 en el cual el extracto a tratar contiene un electrolito.

45º.- Un método según el punto 44 en el cual los cationes del electrolito son los mismo que los de la sal con que se trata el dextrano reticulado.

46º.- Un método según los puntos 44 o 45 en el cual la concentración de electrolito en el extracto es 0,05 a 0,5N.

47º.- Un método según cualquiera de los puntos 39 a 46 en el cual la solución del material polipéptido deseado se lava del dextrano reticulado con una solución alcalina.

48º.- Un método según cualquiera de los puntos 17 a 25 en el cual una solución acuosa que contiene el polipéptido deseado es puesta en contacto con un material celulósico debilmente básico, de permutación iónica para adsorber el polipéptido deseado sobre él eluyéndose luego el polipéptido deseado del material de permutación iónica con un electrolito acuoso.

49º.- Un método según el punto 48 en el cual el material de permutación iónica comprende celulosa químicamente modificada para que lleve uno o más de los grupos amino,



dialcoholamino o dialcoholaminoalcoholo.

5

50º.- Un método según el punto 49 en el cual el material de permutación iónica es el producto de reacción de epíclorhidrina, trietanolamina y celulosa sódica o es dietilaminoetil celulosa.

51º.- El método de cualquiera de los puntos 48 a 50 en el cual el material de permutación iónica se tampona a un pH entre 6 y 10.

10

52º.- Un método según el punto 51 en el cual el pH está entre 6,5 y 8,5.

53º.- Un método según los puntos 51 o 52 en el cual la solución a tratar se tampona en esencia al mismo pH que el material de cambio iónico.

15

54º.- Un método según cualquiera de los puntos 48 a 53 en el cual la solución a tratar contiene de 1 a 2% en peso de sólidos secos.

20

55º.- Un método según cualquiera de los puntos 48 a 54 en el cual la elución se efectúa con hidróxido sódico, potásico o amónico diluidos o con carbonato potásico o amónico.

25

56º.- Un método según cualquiera de los puntos 48 a 54 en el cual la elución se efectúa con tampón de fosfato a pH 7,5 o con un haluro de metal alcalino.

57º.- Un método según el punto 17 en el cual se efectúa más de uno de los tratamientos de purificación según los puntos 18 a 56.

58º.- Un método de producir un material polipéptido.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

30

Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a

285152

máquina por una sola cara.

Madrid, 25 ABR. 1963

P.A.

Alberto de Elizaso
Por Fianza

Ariza



285152

AVS.