

PATENTE DE INVENCION

Ref: Case 5269/1+1/E.



298272.

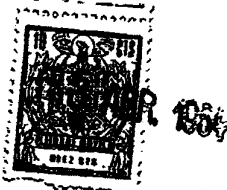
Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de una nueva proteína".

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en Basilea Suiza.

5. El objeto de la invención en la obtención de una nueva proteína, con efecto represor de tumores, en forma pura, de material de plantas de la familia Viscum, especialmente de Viscum album L. sensu latiore o de las clases Loranthus, especialmente Loranthus



298272

europæus L., resumidas a continuación por razones de brevedad bajo la expresión muérdago.

5. El muérdago se emplea en la medicina ya desde hace muchos siglos. Especialmente su efecto en la epilepsia y en los mareos ha sido observado por Plinius en el segundo siglo de nuestra era. Modernamente se emplean los preparados de muérdagos además para la alta presión en las enfermedades de los vasos y la arterioesclerosis, se trata en estos casos de extractos en bruto. Indicaciones de Rudolf Steiner sobre el efecto potencial anti-neoplastico de determinados preparados de muérdago fueron recogidas en los años veinte de este siglo y condujeron asimismo a la preparación de extractos en bruto a los que se adjudicó un determinado efecto en las enfermedades del cáncer. Por lo tanto no es de extrañar que se ha ya intentado obtener principios activos del material de las plantas *Viscum album*. Además de la colina, acetilcolina, ursona y ciertos alcoholes de resinas se aisló ante todo la viscotadna (K. Winterfeld y M. Leiner, Ciencias Naturales 42, 487 (1955)). Se trata en este último caso de un polipepturo que se destaca por su efecto cardíaco y además posee propiedades fuertemente excitantes y necrotizantes. A estas propiedades necrotizantes de la viscotoxina se adjudicó también el atrofiamiento de tumores de inyección en los ratones, observado en la aplicación intratumoral de extractos completos de muérdago.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

Las propiedades extraordinariamente tóxicas de la viscotoxina dificultan sin embargo la aplicación intravenosa de esta substancia o de los extractos comple-

30.



tos y el efecto de un ²⁹⁸²⁷²tratamiento sistémico así sobre el crecimiento de tumores, contrario al tratamiento intratumoral prácticamente sin importancia, es por lo menos problemático.

5. Ultimamente se ha dirigido el interés especialmente a los componentes proteínicos del jugo de muérdago prensado.

Así han realizado Selawry, Vester, Mai y Schwartz

10. [Hoppe-Seylers Zschr, *physiol. Chem.* 324, 262 - 281 (1961)] 7 ensayos sobre el efecto de distintos métodos de separación sobre el jugo del muérdago. Así resultó que del jugo claro, mediante precipitación con acetona, ante todo sin embargo con sulfato amónico hasta una molecularidad de 1,9 y siguientes diálisis y secado en vacío del retentato, se puede obtener un producto proteínoso que, en comparación con el material de partida, tiene un mayor efecto antitumoral, pero sin embargo aún considerable toxicidad.

15. También Winterfeld et al [Arneimittelforschung 13, 29 (1963)] 7 dirigió su atención al componente proteínico. Trabajaron con precipitación ácido clorhídrico de un extracto de muérdago acuoso. Las fracciones desnaturalizadas, así obtenidas, seguramente debido al tratamiento con ácido clorhídrico, muestran, en comparación con el material de partida, también un efecto mayor. También aquí su toxicidad es considerable.

20. Se ha descubierto ahora que del material de las plantas *Viscum album L.* y las clases *Loranthus*, especialmente del muérdago de los árboles de follaje, tales como el muérdago de encinas, manzanos o álamos, se

25.

30.

298272



puede aislar una nueva proteína nativa en forma pura.

Esta proteína ha recibido la característica Nxl. Esta se puede dividir aún en distintas fracciones, cuyas denominaciones se explicarán más abajo con más deta-

5. lle. Esta proteína, ó sus distintas fracciones o mezclas de las mismas, poseen en comparación con el jugo un efecto antitumoral aumentado en aprox. 100 veces y son comparativamente poco tóxicas. El efecto antitumoral se investigó por ej. en tumores ascites, tales como sarcoma 180 en ratones, además en cultivos de células (por ej. HeLa- o sarcoma 180; así como hígado Chang).

10. La proteína Nxl se caracteriza además también por la falta de un efecto sobre la presión sanguínea y otros efectos indeseables de los extractos completos del muérdago u otros productos proteinosos conocidos, menos purificados o ya desnaturalizados.

15. La nueva proteína se puede emplear por lo tanto como medicamento para combatir tumores y otras enfermedades cancerosas.

20. En la hidrólisis ácida de la proteína según la presente invención se obtienen los siguientes ácidos amínicos (entre paréntesis el contenido en %): Cys (2,9) Met (1,6), His (1,3), Tyr (3,8), Phe (3,8), Lys (5,7), Ileu (6,7), Pro (5,4), Thr (5,8), Ser (6,0), Leu (8,1) Glu (9,2), Ala (6,0), Asp (11,2), Gly (6,6), Arg.(13,5) así como amoniaco (aproxi. 7,2) llamando especialmente la atención el elevado contenido en arginina.

25. La nueva proteína o sus componentes se obtienen separando el jugo de prensado del material de la planta
- 30.



293272

del muérdago, preferentemente de las clases arriba mencionada, y ante todo el jugo de prensado de tallos y hojas, de las impurezas en forma de lodos, convenientemente mediante centrifugación, y el jugo claro así obtenido, o un extracto acuoso equivalente.

5.

a) se pone con una solución acuosa de sulfato amónico a una molecularidad de aprox. 1,6 con otra solución de sal a una molecularidad correspondiente al efecto de separación de una solución de sulfato amónico aprox. de 1 mol; y a continuación la solución separada de la parte precipitada se pone mediante

10.

ulterior, en caso dado sucesiva, adición de solución de sulfato amónico a una molecularidad de aprox. 1,9 ó con otra solución de sal a una molecularidad correspondiente, y

15.

b) las partes separadas por medio de sal en la segunda operación de separación en precipitación con sal se dializan y se aísla la parte insoluble en agua del retentato y a continuación, si se desea,

20.

c) la proteína así obtenida se separa por tratamiento con sal mediante tratamiento con solución de sulfato amónico hasta una molecularidad de máximo 0,4 o con otra solución de sal hasta una molecularidad correspondiente, y si se desea,

25.

d) la solución obtenida se limpia en un polidextrangel, convenientemente con propiedades intercambiadoras de iones, o en un medio de absorción equivalente y, si se desea, se separa en las distintas fracciones.

30.

Esquemáticamente se puede representar este procedimiento como sigue, habiéndose agregado la denominación



de las fracciones:

298272

Jugo de prensado

Separación de las impurezas en forma de lodos

Jugo clarificado (o extracto de agua equivalente)

Separación por medio de sal hasta una molecularidad

[$(NH_4)_2SO_4$] de aprox. 1,0.

Precipitación de proteínas Na (ligeramente activa)

Solución

Separación por medio de sal hasta una molecularidad

[$(NH_4)_2SO_4$] de aprox.

1,3 → Precipitación fracción de proteína Nb

1,5 → Precipitación fracción de proteína Nc

1,7 → Precipitación fracción de proteína Nd

1,9 → Precipitación fracción de proteína Ne

Nx (activa)

Solución (ligeramente activa)

Diálisis individual o en conjunto

Solución

Retentato

(Indice 2)

Proteína Nx2

(resp. Nb2, Nc2 etc)
ligeramente activa

Precipitación

(Indice 1)

Proteína Nx1 (resp. Nb1, Nc1, etc).
activa

Separación por medio de sal hasta una molecularidad de 0,4 (= índice y) $(NH_4)_2SO_4$

Proteína Nx1y insoluble
(Indice 1)

Proteína Nx12y soluble (resp. Nb12y, Nc12y, etc.)
(Indice 2)

Limpieza sobre poldextrangel

Fracciones Nx12y I, II, etc.



5. Como las fracciones de proteínas activas se desnaturalizan muy fácilmente, todas las operaciones se han de efectuar en frío, convenientemente a aprox. 0°. El jugo de prensado y el jugo clarificado se han elaborar en estado lo más fresco posible o se han de congelar.

10. Las operaciones de separación mediante sal se efectúan ventajosamente en una solución de sulfato amónico 2-4 molecular, se trabaja agitando y se deja reposar durante varias horas, convenientemente por ej. 24 horas. La separación de la precipitación se efectúa cada vez mediante una fuerte centrifugado. En lugar de sulfato amónico se puede emplear cualquier otra sal usual en la química de las proteínas para la separación mediante sal.

15. La diálisis de las fracciones Nb - Ne ó de mezclas de las mismas (por ej. Nb-d, Nc-e, ó Nb-e = Nx) se efectúa por ej. mediante mangas de celofán contra agua destilada, cambiándose ventajosamente varias veces el recipiente. La parte precipitada en el retentato (denominada con el índice 1, por ej. Nbl, Nb-el = Nxl, etc.) se separa, convenientemente mediante un fuerte centrifugado. Esta ya posee una actividad considerable y se puede lavar por ej. con agua y liofilizar para su empleo.

25. La separación mediante sal, a efectuar en caso dado (solución en una solución de sal acuosa), se efectúa ventajosamente mediante adición en porciones de una solución de sal acuosa, por ej. solución acuosa de sulfato amónico 0,35 molecular u otras soluciones de sal correspondiente y cada vez con centrifugación y agitación de nuevo. Ventajosamente se separa mediante sal sin en-

30.



bargo solo con solución de sulfato amónico 0,1 molecular con lo que se disuelven menos materiales acompañantes inactivos.

Al final se puede emplear aún algo de agua destilada.

5.

Las partes insolubles (denominadas con otro 1, pudiendo agregarse la molecularidad de la solución de precipitación mediante sal (y), por ej. Nb 11_{0,1} ó Nb 11_{0,35}, son de actividad débil, mientras que las partes solubles (denominadas con el índice 2, por ej, Nb 12_{0,1} ó Nb 12_{0,35}) son de actividad fuerte, Las fracciones insolubles se pueden emplear por ej. después de lavar con agua y liofilizar.

10.

Ventajosamente se emplean sin embargo las fracciones solubles (Nx12_{0-0,4}, etc., especialmente Nx12_{0,1} ó Nx12_{0,35}). Sorprendentemente se pueden transformar en soluciones acuosas altamente concentradas. Esto se puede efectuar separando mediante sal, por ej. como arriba indicado, convenientemente en con una solución de sulfato amónico acuoso 3 molecular, se centrifuga, se frota el material sólido con poca agua y esto se repite varias veces hasta que el material separado por centrifugación, ya con poca agua, se pueda "licueficar" a una solución altamente concentrada, Estas fracciones se pueden separar también en la forma usual mediante diálisis de las sales inorgánicas, centrifugar el retentado, después de lavar con agua y secar por congelación la precipitación para su uso.

15.

20.

25.

30.

Convenientemente se limpia sin embargo más aún la solución obtenida por la separación con sal, en caso

298272



dado en la forma altamente concentrada, obtenida por separación mediante sal y ulterior "licuefacción"

arriba descrita. Para ello se emplea ventajosamente un polidextrangel, convenientemente con propiedades

intercambiadoras de iones, ante todo con grupos básicos, por ej. DEAE-Sephadex, o un medio equivalente

y, si se desea, se descompone en fracciones. En el medio de absorción se retienen impurezas teñidas. La eluación

se puede efectuar por ej. en un amortiguador de acetato sódico (0,1 molecular y ascendente),

Ventajosamente se efectúa aquí primeramente una limpieza previa en un bloque de medio de absorción, tal como DEAE-Sephadex, a través del cual se filtra la fracción a limpiar. A continuación se realiza una cromatografía de columna, propiamente dicho, en el mismo material. Convenientemente se transforma para ello la fracción filtrada por separación mediante sal y ulterior "licuefacción" como arriba indicado, en una solución altamente concentrada, con lo que se puede mantener más pequeña la dimensión de la cromatografía. En la eluación que por ej. se efectúa con un amortiguador de acetato sódico (0,1 molecular y ascendente), se puede reconocer, por ej. con ayuda del espectro ultravioleta, a base de la máxima de extinción una clara separación en varias fracciones, si las cuales la primera (I) absorbente en aprox. 270 μ , posee la máxima actividad.

Las fracciones se pueden liofilizar o para retirar las sales someterse a una precipitación con acetona o con otro disolvente orgánico miscible con agua

2982723



o dializarse, y liofilar la parte insoluble del retentato. Pero también como arriba indicado se pueden transformar por separación mediante sal y "licuefacción" de los precipitados en soluciones acuosas altamente concentradas.

5.

Otra ulterior separación fina se puede lograr mediante electrofóresis de gel de almidón, mientras que las sustancias en la electrofóresis de papel se desnaturalizan por la absorción irreversible en el papel.

10.

Según una forma de ejecución especialmente preferente se procede preparando las fracciones No-e 12_{aprox.} 0,1 ó 0,35 que se destacan por una actividad extraordinariamente elevada y una toxicidad comparativamente reducida.

15.

Una modificación del procedimiento para la obtención de la nueva proteína consiste en que en lugar de la operación de separación por sal a) se efectúa una precipitación de proteína con un disolvente orgánico miscible con agua, preferentemente acetona, o también con un alcohol, tal como metanol ó etanol y a continuación se elabora la proteína precipitada según las etapas b) y en caso dado c) y d).

20.

La precipitación se efectúa también a temperatura baja, por ej. -5° hasta -10°.

25.

Otra modificación del procedimiento consiste en que el jugo clarificado o un extracto de agua correspondiente o la sustancia seca correspondiente, se dializa y el retentato entonces se elabora según a), b) y en caso dado c) y d) o convenientemente mediante precipitación con el disolvente orgánico miscible con agua,

30.

298272



separación mediante sal según c) y en caso dado ulterior elaboración según d).

La proteína Nxl o sus fracciones se pueden emplear como medicamentos en las enfermedades del cancer.

5. Para ello se pueden presentar por ej. en forma de preparados farmacéuticos que los contengan junto con materiales vehículo farmacéutico, orgánicos o inorgánicos, que sean adecuados para la administración parental. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por
10. ej. como ampollas secas. En caso dado estarán esterilizadas y/o contendrán materiales auxiliares, tales como medios de conservación, estabilización, reticulación o emulsión, sales para variar la presión osmótica y amortiguadores. Asimismo pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos.
- 15.

La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados Celsius.

EJEMPLO 1

20. 1) 100 kg de Viscum album (mali), recogidos en Febrero, se liberan, pocas horas después de su recolección, de las bayas y de los tallos más gruesos (\varnothing 8 mm) y se lavan a fondo en frío. Los restantes 88 kg se desmenuzan en la máquina de picar carne bajo enfriamiento
25. (se pueden agregar pequeños trocitos de hielo). Mediante intenso enfriamiento de la melaza a -20°C se completa la ruptura de la célula y en el ulterior prensado se logra un mayor rendimiento de jugo. Exprimiendo en una prensa de madera entre telas con aprox. 10 atm. de presión se obtienen 24 litros de jugo de prensado,
30. después



298272

de cambiar la posición y volver a prensar otros 8 litros. La torta de prensado se desecha. El jugo turbio de prensado marrón-verdoso (32 l) se libera centrifugando durante 10 minutos, a 4000 r.p.m. a unos 0°C, del lodo verde que es inactivo. El jugo de prensado claro (31 l) se congela hasta su ulterior elaboración a -20°C y de esta manera se obtienen las proteínas nativas en estado preservado.

5.

10.

15.

2a) El jugo claro, descongelado, se mezcla a 0°C lentamente y agitando con solución de sulfato amónico 3,8-molecular (357 ml por litro de jugo) y todo ello (ahora en total 42 litros) se deja reposar durante 24 horas a 0°C. La proteína precipitada mediante sal (Na. 1200 g) se centrifuga fuertemente durante 5 minutos a 20.000 g en frío. Posee reducido efecto tumoral y es fuertemente tóxico.

20.

25.

30.

2b) Para obtener la cantidad principal de las proteínas en bruto activas se mezcla el jugo superpuesto, igual que arriba, con solución de sulfato amónico 3,8 molecular hasta el doble de la cantidad inicial (62 l) es decir, hasta que la molecularidad sea 1,9 y nuevamente se deja reposar durante 24 horas a 0°C. La precipitación obtenida (Nx. 900 g) se centrifuga fuertemente como arriba y se lava dos veces con el mismo volumen de una solución de sulfato amónico 2,5 molecular y se centrifuga y hasta la ulterior elaboración se congela a -20°C. La solución residual contiene aún grandes cantidades de proteínas que se precipitan mediante sal con ulteriores adiciones de sulfato amónico. Estas son sin embargo cancerostáticamente inactivas. La pro-



298272

teína en bruto obtenida de 1,9 molecularidad posee considerable efecto cancerostático.

5. 3) La proteína en bruto se suspende con 2 - 3 veces su volumen de agua, ascendiente el volumen total a unos 7 litros, y a 0° se desliza a través de mangas de celofán "Visking-seemless" tipo "Thin-wall" diámetro de poros 24 Å, 3 veces, cada una durante 10 horas contra unos 100 litros de agua desionizada y, a continuación, otra vez durante 10 horas contra 100 litros de agua destilada. Antes de cada cambio de recipiente se arremolina bien el contenido de la manga. Bién la manga o el agua en el recipiente se mantiene en movimiento durante el proceso de dialización.

10. La parte precipitada en el retentato exento de sal (Nx1, 100 g) se centrifuga durante 20 minutos a 20.000 g en frío de la parte soluble inactiva (Nx2, 200 g), se lava una vez con la doble cantidad de agua destilada, se centrifuga como arriba y se separa mediante sal con sulfato amónico como sigue:

15. 4) La Nx 1 insoluble en agua destilada se mezcla con el mismo volumen de solución de sulfato amónico 0,35 molecular y, por ej. en un homogenizador de cristal, se homogeniza brevemente enfriando. Después se centrifuga fuertemente (20.000 g) durante 5 minutos y el procedimiento se repite tantas veces hasta que la parte superior de la separación tenga solo un color de te marrón claro (aprox. después de unas 6-8 separaciones mediante sal). Después se repite el mismo procedimiento otras tres veces con agua destilada, con lo que la molecularidad baja escalonadamente y se disuelven ulteriores can-
- 20.
- 25.
- 30.



98272

tidades de substancia activa. Todas las partes superiores se reunen y ahora o bien se siguen limpiando o se emplean directamente. Para ello se libera por diálisis directa de nuevo del sulfato amónico, el retentato se centrifuga, la precipitación se lava con poca agua destilada y se seca por congelación (Nx 120,35, 45 g). En esta forma se conserva el preparado también sin enfriamiento a baja temperatura y se puede recibir en solución de sal para la aplicación. Posee un elevado efecto canceroestático.

5) Si la proteina Nx 120,35 se ha de seguir limpiando, se vierte la solución marrón oscuro (1 litro) que contiene aprox. 45 g de Nx 120,35, directamente después de la separación mediante sal sobre 1 kg de polidextrangel con grupos básicos (DEAE-Sephafex A 50 de la firma Pharmacia, Uppsala).

El absorbedor se suspendió primeramente en agua; se decantaron las partículas finas, se lavó con ácido clorhídrico 0,5-n, agua, sosa caústica 0,5-n, agua, ácido acético 0,5-n y finalmente con amortiguador de acetato sódico 0,1 molecular del pH 5,5 y se introdujo en una columna de unos 10 cm de diámetro. El componente de color marrón de la solución alimentada se sujeta en la parte superior de la columna durante la elución con amortiguador de acetato sódico 0,1 molecular. La fracción de proteina que aparece primero, absorbente a 270 m μ , se separa mediante sal por adición de sulfato amónico sólido hasta la molecularidad de 3, se deja reposar durante 24 horas, se centrifuga durante 5 minutos a 20.000 g (10 - 20 cm³) se suspende con el triple volumen de agua

298272



5. y después se dializa durante 30 horas, cada vez contra 5 litros de agua destilada como arriba. La parte del retentato obtenida (Nx 12_{0,35} I, 5 - 10 g) se centrifuga fuertemente durante 5 minutos, se lava una vez con el triple volumen de agua y se liofiliza. Posee una elevada actividad canceroestática.

EJEMPLO 2

10. En lugar de Viscum album mali, recolectado en febrero, se emplea Viscum album populi, recolectado en verano hasta octubre. Mientras que el muérdago de manzano en una recolecta en octubre da con el mismo rendimiento de jugo solo aproximadamente una décima parte de la proteína activa, al igual que en una recolecta en febrero, en el muérdago de álamo en octubre está fuertemente reducida principalmente la parte en Na, mientras
15. que en proteína en bruto Nx aún se obtienen 400 g, es decir la mitad de lo que se logra de una recolecta en febrero de muérdago de manzano. De estos 400 g se pueden separar después de la diálisis 38 g de Nx 1, que
20. entonces da cantidades correspondientes de Nx 12 y Nx 12 I. Por lo demás se procede con métodos adaptados a las correspondientes cantidades modificadas, igual como en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3

25. En lugar de la separación mediante sal con sulfato amónico en el apartado 2) del ejemplo 1, se puede precipitar también mediante adición en porciones de acetona a -5°. Tan pronto como no haya ninguna precipitación más se termina la adición de acetona y la solución se deja reposar durante 24 horas a -10°. Después
- 30.

293272



de separar por centrifugación la proteína en bruto se dializa como en el apartado 3 (ejemplo 1) y se procede en forma correspondiente. También aquí se obtiene la proteína Nx 12 y finalmente Nx 12 I, pero en un rendimiento menos bueno.

5.

EJEMPLO 4

Si después de la separación Sephadex en el apartado 5) ejemplo 1, la fracción final Nx 12_{0,35} I en frío se precipita con acetona en lugar de separar mediante sal, entonces la parte de la sal anexa (de la solución 0,1 molecular) no es tan grande y se puede liofilizar directamente sin dializar anteriormente.

10.

EJEMPLO 5

En lugar de como en el apartado 2, ejemplo 1, se puede dializar el jugo claro también antes de la separación mediante sal de las proteínas. De los aprox. 160 g de substancia en seco, que contiene 1 litro de jugo claro, son 125 g dializables y 35 g no dializables. De la parte no dializable se precipitan entonces las proteínas nativas convenientemente con acetona (vease ejemplo 3).

15.

20.

Una precipitación mediante separación por sal exige una ulterior dialización. La parte precipitada con acetona se lava en frío varias veces con agua destilada, se centrifuga cada vez fuertemente y finalmente se separa mediante sal como en el apartado 4 (ejemplo 1) y se sigue elaborando como en el apartado 5 (ejemplo 1),

25.

EJEMPLO 6

30.

Se procede como descrito en el ejemplo 1, párra-

298272



fos 1 - 3 y se continua según el ejemplo 1, párrafo 4, pero sustituyendo la solución de sulfato amónico 0,35 molecular por una solución de sulfato amónico 0,1 molecular. Se obtiene la fracción Nx 12_{0,1} de elevado efecto cancerostático.

5.

5a) la solución proteínica así obtenida se filtra a través de un bloque "DEAE-Sephadex". Para este fin se prepara en el filtro de vacío una capa de DEAE-Sephadex A-5P cuya altura corresponda aproximadamente al diámetro. Por una parte en peso de proteína se emplea 30 partes en volumen de Sephadex húmedo. Después de la filtración de la solución proteínica se lava ulteriormente con amortiguador de acetato sódico-ácido acético 0,1 molecular del pH 5 - 6. La solución del

10.

filtrado se mezcla entonces a 2 \times agitando con sulfato amónico hasta una molecularidad de 3 y se guarda durante 16-24 horas en la nevera. Centrifugando brevemente se puede separar la precipitación que contiene el material activo y después de frotar repetidas veces con muy poca agua y centrifugar, transformar en una solución acuosa altamente concentrada ("licuefacción").

15.

20.

Esta solución se sigue diluyendo entonces con agua o un amortiguador de acetato sódico-ácido acético 0,1 molecular del pH 5,5 hasta una concentración adecuada para la cromatografía.

25.

5b) La cromatografía se efectúa en DEAE-Sephadex A-50 tratado previamente como en el ejemplo 1. Por 20 ml de solución es suficiente un volumen de Sephadex de 140 - 200 ml con una proporción entre diámetro/altura de 1:20 hasta 1:40. Después se eluye con amortiguador

30.



acetato sódico-ácido acético 0,1 molecular (pH 5,5).

- Las fracciones de proteína absorbentes a 270 μ se separan mediante sal, en recipientes aparte, mediante adición de sulfato amónico hasta una molecularidad de 3,0 se deja reposar durante 24 horas a 28°C y se centrifuga. A continuación se disuelven las precipitaciones, bien mediante repetidos y cuidadosos frotos con poca agua y centrifugado, como arriba indicado o mediante diálisis según el ejemplo 1 se separan mediante sal. En este último caso se liofiliza todo el retentato (precipitación y solución). La substancia Nx. 12_{0,1} obtenida de la primera fracción de eluado absorbente a 270 μ posee una elevada actividad cancerostática.

NOTA

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento se refiere a unas Solicitudes de Patentes presentadas en Suiza, con fecha 4 de abril de 1963, nº 4332/63 y 13 de enero de 1964 nº 305/64, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA NUEVA PROTEINA"; caracterizándose por lo siguiente:
30. 1ª.- "Procedimiento para la obtención de una

298272



- nueva proteina", en forma purificada, del jugo claro de muérdagos liberados de las impurezas en forma de lodos, o de un extracto de agua equivalente, caracterizado, porque el jugo claro o el extracto de agua
5. a) se pone con una solución acuosa de sulfato amónico ó con otra solución de sal a una molecularidad correspondiente al efecto de separación mediante sal de una solución de sulfato amónico de aprox. 1-molecularidad y a continuación la solución separada de la parte precipitada se pone mediante ulterior, en caso dado sucesiva adición de solución de sulfato amónico, a una molecularidad de aprox. 1,9 o con otra solución de sal a una molecularidad correspondiente, y b) las partes separadas por medio de sal en la segunda operación de separación mediante sal se dializan y se aísla la parte del retentato insoluble en agua y a continuación si se desea, c) la proteina así obtenida se separa mediante tratamiento salino tratando con solución de sulfato amónico hasta una molecularidad máx. aprox. de
10. 0,4 o con otra solución de sal hasta una molecularidad correspondiente y, si se desea, d) la solución obtenida se limpia en un polidextrangel, convenientemente con propiedades intercambiadoras de iones, o en un medio de absorción equivalente y, si se desea, se separa en las
15. distintas fracciones.
20. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en lugar de la operación de separación mediante sal se efectúa una precipitación proteínica con un disolvente orgánico miscible con agua y
25. a continuación la proteina precipitada se elabora
- 30.



298272⁵³ AE

según las etapas b) y en caso dado c) y d).

- 5. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el jugo claro o el correspondiente extracto de agua o la correspondiente substancia seca se dializa y el retentato entonces se elabora, o bien según a), b) y en caso dado c) y d), o bien mediante precipitación con el disolvente orgánico miscible con agua, separación mediante sal según c) y en caso dado ulterior elaboración según d).
- 10. 4ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-3, caracterizados porque se parte de un jugo claro o extracto acuoso obtenido de los tallos y hojas de las plantas de muérdago.
- 15. 5ª.-Procedimientos según las reivindicaciones 1 - 4, caracterizados porque se parte del jugo claro o extracto acuoso obtenido del material de las plantas del muérdago de los árboles de follaje.
- 20. 6ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1 - 5, caracterizados porque se parte del jugo claro o extracto acuoso obtenido de los muérdagos de las encinas, manzanos o álamos.
- 25. 7ª.-Procedimientos según las reivindicaciones 1 - 6, caracterizados porque se parte del jugo claro o extracto acuoso obtenido de los muérdagos del manzano recolectados en febrero.
- 30. 8ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1 - 6, caracterizados porque se parte del jugo claro o extracto acuoso obtenido de los muérdagos de álamos recolectados en verano-octubre.
- 30. 9ª.- Procedimientos según las reivindicaciones

298272



1 - 8, caracterizados porque las operaciones se efectúan en frío.

5. 10ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-9, caracterizados porque la operación de separación mediante sal se efectúa con una solución de sulfato amónico 2-4 molecular.

10. 11ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-10, caracterizados porque la separación mediante sal se efectúa con una solución de sulfato amónico 0,4 molecular o una solución de otra sal correspondiente en relación con su efecto, separador mediante sal.

15. 12ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-10, caracterizados porque la separación mediante sal se efectúa con una solución de sulfato amónico de alrededor de 0,1 molecular o una solución de otra sal correspondiente en relación con su efecto separador mediante sal.

20. 13ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-11, caracterizados porque se aísla la fracción de proteína Nc-e 120,35.

14ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-11, caracterizados porque se aísla la fracción de proteína Nc-e 120,1.

25. 15ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-14, caracterizados porque en la etapa d) se emplea un povidextran con grupos básicos.

16ª.- Procedimiento según la reivindicación 15 caracterizado porque se emplea un intercambiador de povidextran, con grupos básico o un medio equivalente.

30. 17ª.- Procedimiento según las reivindicaciones



1-16, caracterizados porque la limpieza previa se efectúa mediante filtración a través de una capa en forma de bloque del medio de absorción.

5. 18ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-17, caracterizados porque se cromatografía en una columna del medio de absorción y se descompone en fracciones.

10. 19ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-18, caracterizados porque el medio de absorción se eluye con amortiguador de acetato de sodio con una molecularidad 0,1 y ascendente.

20ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-19 caracterizados porque se separa la primera fracción absorbente en ultravioleta a 270 mμ.

15. 21ª.- Procedimientos según las reivindicaciones 1-20, caracterizados porque en cualquier etapa del procedimiento, después de la separación mediante sal c) se efectúa una separación mediante sal y la parte separada mediante sal y centrifugada mediante repetidos frotos con poca agua y centrifugado, se transforma en una solución amortiguada o acuosa altamente concentrada.

25. 22ª.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque se separa mediante sal con una solución de sulfato amónico 3-molecular u otra solución de sal correspondiente en relación con el efecto separador mediante sal.

30. 23ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 2-15, caracterizado porque como disolvente miscible con agua se emplea acetona.



298272

24^a. - Procedimiento para la obtención de una nueva proteína; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 23 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5 .

Madrid, 5^o ABR. 1934

CIBA SOCIETE ANONYME

J. GOMEZ ACBO Y MODESTO
AA