

323176



PATENTE DE INVENCION

---

Case 5637/1+2

---

323176

*Memoria Descriptiva*

*sobre*

"PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE  
UNA PROTEINA".

---

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

---

El objeto de la patente 298 272 es un  
procedimiento para la obtención de una proteína  
purificada con efecto anti-tumoral de material  
vegetal de la familia del *Viscum*, especialmente  
5. del *Viscum album L. sensu latiore* o de la familia



- del Loranthus, especialmente del Loranthus europaeus L, resumidas bajo la expresión "muérdago". Este procedimiento se caracteriza porque el jugo de prensado claro del muérdago, liberado de las impurezas en forma de lodos, o un extracto acuoso equivalente, así
5. como los dializados o substancias secas del mismo, se precipitan en forma de sal mediante una solución acuosa de sulfato amónico u otra solución de sal y la fracción proteínica, que se obtiene entre una molaridad en sulfato amónico de aproximadamente 1 y 1,9,
10. se dializa contra agua, y, si se desea, la parte insoluble en agua del retentado hasta una molaridad de máximo 0,4 en sulfato amónico, se salifica con una solución acuosa de sulfato amónico u otra solución de sal común y, en caso dado, la fracción proteínica obtenida se limpia en un medio de absorción, tal como en un gel polidextránico, preferentemente a través de dos escalones, es decir, en un bloque, y a continuación en una columna del medio de adsorción.
15. La proteína obtenida mediante precipitación como sal y ulterior diálisis, llamada Nx o bien Nx 1, así como sus fracciones obtenidas después del lavado Nx 11<sub>0-0,4</sub> y Nx 12<sub>0-0,4</sub>, especialmente las fracciones Nx 11<sub>0,1</sub>, Nx 11<sub>0,35</sub>, Nx 12<sub>0,1</sub> o Nx 12<sub>0,35</sub>, y sus fracciones ulteriormente purificadas, tales como
20. Nx 12<sub>0,1</sub>I o Nx 12<sub>0,35</sub>I, muestran destacadas propiedades inhibitoras de los tumores; sin embargo, aún están impurificadas con partes proteínicas inactivas y especialmente con partes proteínicas atípicamente
25. tóxicas sin actividades inhibitoras de los tumores.
- 30.



- Mediante la electrofóresis de folios de celulosa acetilica efectuada en forma conocida se puede demostrar que la composición de las fracciones proteínicas obtenidas según el procedimiento de arriba se mantiene esencialmente igual. Se emplean por ejemplo, para esta electrofóresis los folios de membrana suministrados por la firma Carl Schleicher und Schüll (Fabricante: Membranfiltergesellschaft Göttingen) y se realiza en una cámara de material sintético especialmente construída bajo condiciones normalizadas (temperatura: 22°; tensión: 18 Volt/cm; tiempo de recorrido: 2 horas; tampón: veronal-sodio, acetato sódico, ácido clorhídrico n/10 con fuerza de iones 0,025 y pH 8,6; formato del folio: 180 x 25 mm; aplicación: 60  $\gamma$ ).
- 5.
- 10.
- 15.

- Para hacer visibles las distintas bandas proteínicas se tiñe con negro amídico, según prescripción conocida y los folios secados, no hechos transparentes, se evalúan, por ejemplo, en el aparato "Analytrol" de la firma Beckman a un proteino-grama.
- 20.

- Muestra así, por ejemplo, la electroforesis efectuada con la fracción nx 12<sub>0,1</sub>I la composición representada en la figura 1. Se trata aquí en la superficie denominada con A de la parte específicamente anti-tumoral de esta fracción proteínica y en la superficie denominada con B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de la parte en materiales secundarios, mientras que la fracción C representa la parte atípicamente tóxica, sin embargo no inhibidora de los tumores. Es, por lo tanto,
- 25.
- 30.



- importante una separación de los materiales secundarios y especialmente de la fracción atípicamente tóxica. Mediante una ulterior limpieza por cromatografía simple, sin embargo, no se puede lograr una
5. variación esencial de la composición de las fracciones proteínicas. Además, la cromatografía de columnas para la obtención preparativa de fracciones activas antitumorales proteínicas resulta poco adecuada.
10. Se ha descubierto ahora sorprendentemente que los materiales secundarios y especialmente la parte atípicamente tóxica de las fracciones proteínicas que se obtienen según el procedimiento de la patente Nº 298 272, especialmente de las fracciones Nx 11<sub>0-0,4</sub> o Nx 12<sub>0-0,4</sub>, tales como Nx 11<sub>0,1</sub>, Nx 11<sub>0,35</sub>, Nx 12<sub>0,1</sub> o Nx 12<sub>0,35</sub><sup>I</sup>, o sus fracciones purificadas Nx 12<sub>0,1</sub><sup>I</sup> o Nx 12<sub>0,35</sub><sup>I</sup>, se pueden separar, si las soluciones acuosas de una de estas fracciones se ultra-centrifugan y la fracción proteínica
15. anti-tumoral se obtiene en estado altamente purificado de la sedimentación.
20. Con ayuda de la electroforesis anteriormente descrita se puede demostrar que, según el procedimiento de la presente invención, ante todo la parte principal de los materiales lastre denominados con B<sub>1</sub> y especialmente los componentes C
25. atípicamente tóxicos de las fracciones proteínicas empleadas como materiales de partida (véase figura 1; la flecha indica el lugar de aplicación y la ordenada se refiere a la extinción) se acumulan en
- 30.

323176-5-



el decantado (véase figura 2) y se pueden separar en forma sencilla, mientras que en la sedimentación se acumula la fracción proteínica anti-tumoral ampliamente purificada (véase figura 3).

5. El procedimiento de la ultra-centrifugación se puede realizar según métodos en sí conocidos. La ultra-centrifugación se efectúa a revoluciones lo más elevadas posible, preferentemente a más de 20.000 r.p.m. exponiéndose la solución empleada como material de partida a un campo de gravedad de más de 100.000 g, por ejemplo 170.000 g. Esto se mantiene durante varias horas, por ejemplo durante 15 - 30 horas, trabajándose para proteger las fracciones proteínicas en frío, es decir, a
10. temperaturas que no sobrepasen esencialmente los  $+10^{\circ}$ , por ejemplo, entre  $0^{\circ}$  y  $+10^{\circ}$ . Si se desea se puede repetir la operación de la ultra-centrifugación, y/o la fracción proteínica limpiada obtenida se puede seguir limpiando, por ejemplo, por
15. filtración, tal como filtración estéril, lográndose una ulterior separación de materiales secundarios.  
La fracción proteínica altamente purificada obtenida se puede almacenar en forma liofilizada; se libera, sin embargo, convenientemente antes de la operación de liofilización, mediante diálisis contra agua, de los componentes inorgánicos, especialmente de la sal común.
20. La solución acuosa, en caso dado salada, empleada en el procedimiento de la presente invención como material de partida, de las fracciones
- 25.
- 30.



- proteínicas enriquecidas, obtenidas según el procedimiento descrito en la patente N° 298 272, se puede obtener, por ejemplo, liberando las fracciones proteínicas previamente limpiadas, en caso dado
5. presentes como precipitado de sal, preferentemente como precipitado de sulfato amónico, mediante amasado con poca agua, ampliamente de las partes de sal, el material proteínico sin disolver se separa, por ejemplo, mediante centrifugación
10. normal a unas 10.000 - 15.000 r.p.m. de la solución salina y el residuo sedimentado se disuelve con agua y, si se desea, se dializa contra agua o preferentemente contra una solución salina o tampón, especialmente una solución fisiológica salina. Las
15. fracciones proteínicas saladas, previamente limpiadas, se pueden disolver también directamente en agua y la solución se puede ajustar mediante dialización contra agua o una solución salina adecuada a un contenido salino deseado. La solución acuosa
20. así obtenida se puede emplear entonces directamente para el ultra-centrifugado, pero convenientemente se sigue diluyendo o bien con agua o con una solución salina adecuada, especialmente solución fisiológica de sal común. Por lo general, se someten a la ultra-centrifugación soluciones con
25. concentraciones en partes proteínicas del 0,5 - 10 %, preferentemente 1 - 5 %.

Las fracciones proteínicas altamente purificadas obtenidas, según la presente invención,

30. de las fracciones proteínicas empleadas como mate-



- riales de partida arriba mencionados  $Nx 11_{0-0,4}$ ,  
o  $Nx 12_{0-0,4}$ , tales como  $Nx 11_{0,1}$ ,  $Nx 11_{0,35}$ ,  
 $Nx 12_{0,1}$  o  $Nx 12_{0,35}$ , así como las fracciones ul-  
teriormente limpiadas, tales como  $Nx 12_{0,1}I$  o
5.  $Nx 12_{0,35}I$ , liberadas ampliamente especialmente de  
las partes atípicamente tóxicas y materiales las-  
tre ineficaces son especialmente las fracciones  
proteínicas denominadas con  $Nx 11_{0,04}$  UZS y  
 $Nx 12_{0-0,4}$  UZS, tal como  $Nx 11_{0,1}$  UZS,  $Nx 11_{0,35}$  UZS,
10.  $Nx 12_{0,1}$  UZS o  $Nx 12_{0,35}$  UZS, así como por ejemplo,  
 $Nx 12_{0,1}I$  UZS, o  $Nx 12_{0,35}I$  UZS. Se pueden emplear  
como medicamento en las enfermedades de cáncer. Pa-  
ra ello se puede presentar, por ejemplo, en forma  
de preparados farmacéuticos que las contengan junto
15. con materiales excipientes farmacéuticos orgánicos  
o inorgánicos que sean adecuados para administra-  
ción parenteral. Los preparados farmacéuticos se  
pueden presentar, por ejemplo, como ampollas secas.  
En caso dado, estarán esterilizadas y/o contendrán
20. materiales auxiliares, tales como medios de conser-  
vación, estabilización, humectación o emulsión, sa-  
les para variar la presión osmótica o tampones.  
Pueden asimismo contener otros materiales terapéu-  
ticamente valiosos.
25. En los ejemplos siguientes se describe  
la invención con más detalle. Las temperaturas es-  
tán indicadas en grados centígrados.

EJEMPLO 1 -

30. 1) Manteniendo una temperatura de  $0^{\circ}$  has-  
ta  $+5^{\circ}$  se frota 33,2 g del precipitado proteínico



- precipitado del eluado Nx 12<sub>0,1</sub>I (ejemplo 6, apartado 5b de la solicitud de patente 298 272) mediante adición de una solución de sulfato amónico acuoso hasta una molaridad de 3 con 15 ml de agua, con lo
5. que la mayor parte del sulfato amónico adherido se disuelve junto con reducidas cantidades de proteína. La mezcla se centrifuga a 0° durante 15 minutos a 12.000 r.p.m. y se decanta la solución marrón claro de encima.
10. La sedimentación se mezcla gota a gota con agua hasta que se forma una pasta gelatinosa transparente y más tarde una solución muy líquida marrón oscura de 27 ml de volumen final, de la cual 25 ml se dializan en el dializador de agitación durante 16 horas contra unos 20 litros de una solución de sal común acuosa al 0,9%. Se obtiene así una solución clara, marrón oscuro que contiene la proteína al 12,9%.
15. 2) La solución arriba obtenida se diluye mediante adición de solución acuosa al 0,9% de sal común a una concentración de 2,6% y en la ultracentrifugadora (tipo: centrifugadora analítica Spinco, modelo E; carga: rotor SW 39; contenido del tubo: 5 ml) se expone durante 22 horas a una temperatura de 7° mediante 40.000 r.p.m. a un campo de gravedad de 170.000 g. Se forma así una solución teñida de claro situada encima que se decanta y un sedimento marrón negro de consistencia como el alquitrán, que contiene la fracción proteínica
20. Nx 0,1I UZS con efecto anti-tumoral.
- 25.
- 30.

323176 - 9 -



3) Mediante la electroforesis anteriormente descrita se pueden separar las fracciones proteínicas del material de partida Nx 12<sub>0,1</sub>I (figura 1), del decantado Nx 12<sub>0,1</sub>I UZD (figura 2) y de la sedimentación Nx 12<sub>0,1</sub>I UZS (figura 3 y muestran después del tefido con negro amídico y evaluación con el aparato "Analytrol" de la firma Beckman las siguientes composiciones:

	<u>Material de partida</u> Nx 12 <sub>0,1</sub> I	<u>Decantado</u> Nx 12 <sub>0,1</sub> I UZD	<u>Sedimentacion</u> Nx 12 <sub>0,1</sub> I UZS      Nx 12 <sub>0,1</sub> I UZS 2F	
<u>Contenido total en proteína</u>				
en mg	126,5	31,5	95	66
en %	100	25	75	52,5
<u>Materiales acompañantes.</u>				
Superficie B <sub>1</sub> + C	22,9	47,4	13,0	6,8
Superficie B <sub>2</sub>	18,3	11,9	17,6	20,3
<u>Fracción activa</u>				
Superficie A	58,8	40,7	69,4	72,9

(Los contenidos de las superficies A, B<sub>1</sub> + C y B<sub>2</sub> se indican en % del contenido de superficie total).

Aquí es especialmente de destacar que la fracción atípicamente tóxica, en la figura 1 denominada con "C" y los materiales, acompañantes inefi-

323176<sup>10</sup> -



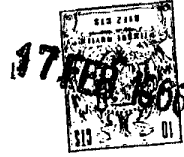
caces adyacentes B<sub>1</sub> se encuentran en el decantado.

- 4) La sedimentación se puede, según el procedimiento descrito bajo 1), volver a disolver en una solución acuosa al 0,9% de sal común y someter la solución a una nueva ultra-centrifugación con ulterior filtración esterilizada a través de una membrana de acetato de celulosa para lograr en la fracción Nx 12<sub>0,1</sub> I UZS una separación total del componente C (figura 4). La sedimentación obtenida, bien según el procedimiento descrito bajo 2) o después de repetida ultra-centrifugación y ulterior filtración, se puede liofilizar dializando preferentemente una solución de la sedimentación, en una solución al 0,9% de sal común, antes contra agua pura. En la forma seca liofilizada el preparado es estable.

EJEMPLO 2 -

- 1) 22,0 g del precipitado sulfato amónico del eluado Nx 12<sub>0,35</sub> I (Ejemplo 1 de la patente Nº 298 272) se disuelven como descrito en el Ejemplo 1 mediante cuidadosa adición de agua (volumen final 20 ml) y a continuación se re-dializa contra una solución acuosa al 0,9% de sal común.
- 2) Esta solución se ajusta mediante adición de ulterior solución acuosa al 0,9% de sal común a una concentración de 1,7% y en la ultracentrífuga (Ultracentrífuga preparativa, Modelo L, empleando un rotor preparativo, tipo 30, firma Beckman/Spinco) se expone a 5º durante 24 horas y 30.000 r. p.m. a un campo de gravedad de 105.000 g.
- 3) La electroforesis del material de par-

323176<sup>11</sup> -



tida, de la sedimentación y del decantado, efectuada, según el ejemplo 1, da los valores siguientes:

	<u>Material de partida</u>	<u>Decantado</u>	<u>Sedimentación</u>
	Nx 12 <sub>0,35</sub> I	Nx 12 <sub>0,35</sub> <sup>I</sup> UZD	Nx 12 <sub>0,35</sub> <sup>I</sup> UZS
<u>Contenido total</u>			
<u>en proteína</u>			
en mg	579	259	320
en %	100	44,7	55,3
<u>Sedimentación</u>			
Superficie B <sub>1</sub> + C	21,1	34,3	7,3
Superficie B <sub>2</sub>	18,7	18,8	22,0
<u>Fracción activa</u>			
Superficie A	60,2	46,8	70,7

(Los contenidos de las superficies A, B<sub>1</sub> + C y B<sub>2</sub> se indican en % del contenido de superficie total).

25. 4) Disolviendo la sedimentación, diálisis contra agua y liofilización se pone la fracción proteínica enriquecida Nx 12<sub>0,35</sub> I UZS 1 en una forma seca estable.

EJEMPLO 3 -

30. 1) La solución de la fracción proteínica



- Nx 12<sub>0,1</sub> obtenida según el ejemplo 6 de la patente Nº 298 272 después de salar con una solución 0,1-m acuosa de sulfato amónico se somete a una así llamada filtración "DEAE-Sephadex-Block". El filtrado
5. se mezcla con una solución de sulfato amónico hasta la molaridad 3 y el precipitado proteínico obtenido se disuelve, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, en poca agua y se redializa mediante una solución acuosa al 0,9% de sal común.
10. 2) La solución diluída con solución acuosa al 0,9% de sal común a un contenido de proteína del 2% se expone a 7<sup>2</sup> durante 24 horas en la ultracentrífuga a un campo de gravedad de 170.000 g.
15. 3) La electroforesis del decantado y del sedimento demuestra que en este último se encuentra la fracción anti-tumoral en forma enriquecida y ampliamente liberada de los materiales secundarios y especialmente de la fracción atípicamente tóxica, mientras que en el decantado prevalecen los mate-
20. riales lastre superfluos y la fracción atípicamente tóxica.
25. 4) Mediante redialización y liofilización se puede poner la fracción proteínica anti-tumoral Nx 12<sub>0,1</sub> UZS 1 en una forma estable.
- NOTA -
30. 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

323176<sup>13</sup> -

17 FEB. 1966



- su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a dos solicitudes de patente presentadas en Suiza, con fechas 19 de Febrero de 1965 y 28 de Diciembre de 1965, bajo los números 2313/65 y 17974/65, respectivamente, acogándose, por 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: "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE UNA PROTEINA"; caracterizándose por lo siguiente:

- 1<sup>a</sup>.- Procedimiento para la purificación de una proteína obtenida de las fracciones proteínicas que se extraen del material vegetal de la familia del *Viscum*, o fracciones proteínicas ulteriormente limpiadas, caracterizado porque una solución acuosa de tales fracciones proteínicas se somete a una ultracentrifugación y la fracción proteínica anti-tumoral se obtiene de la sedimentación en forma altamente purificada.

- 2<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplean las fracciones proteínicas denominadas Nx 11<sub>0-0,4</sub>.

- 3<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplean las fracciones proteínicas denominadas Nx 12<sub>0-0,4</sub>.

- 4<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica denominada Nx 11<sub>0,1</sub>.



- 5<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica denominada Nx 11<sub>0,35</sub>.
5. 6<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica denominada Nx 12<sub>0,1</sub>.
- 7<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica denominada Nx 12<sub>0,35</sub>.
10. 8<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica, ulteriormente limpiada, denominada Nx 12<sub>0,1</sub> I.
15. 9<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque se emplea la fracción proteínica, ulteriormente limpiada, denominada Nx 12<sub>0,35</sub> I.
20. 10<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-9<sup>a</sup>, caracterizado porque la ultracentrifugación se efectúa al número de revoluciones más elevado posible.
25. 11<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 10<sup>a</sup>, caracterizado porque la ultracentrifugación se efectúa a más de 20.000 revoluciones por minuto.
30. 12<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-11<sup>a</sup>, caracterizado porque la solución se expone a un campo de gravedad superior a 100.000 g.
- 13<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindi-

323176<sup>15</sup> -



17 FEB 1966

cación 12<sup>a</sup>, caracterizado porque la solución se expone a un campo de gravedad de aproximadamente 170.000 g.

5. 14<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-13<sup>a</sup>, caracterizado porque la ultracentrifugación se mantiene durante varias horas.

15<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 14<sup>a</sup>, caracterizado porque la ultracentrifugación se mantiene durante 15 - 30 horas.

10. 16<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-15<sup>a</sup>, caracterizado porque se trabaja en frío, especialmente a temperaturas que no sobrepasen esencialmente +10<sup>o</sup>.

15. 17<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 16<sup>a</sup>, caracterizado porque se trabaja a temperaturas de 0<sup>o</sup> hasta +10<sup>o</sup>.

18<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-17<sup>a</sup>, caracterizado porque se repite la ultracentrifugación.

20. 19<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-18<sup>a</sup>, caracterizado porque como material de partida se emplea una solución acuosa con un contenido en partes proteínicas del 0,5 - 10%.

25. 20<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-19<sup>a</sup>, caracterizado porque como material de partida se emplea una solución acuosa con un contenido en partes proteínicas del 1 - 5%.

30. 21<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>-20<sup>a</sup>, caracterizado porque la solución acuosa de la fracción proteínica, empleada como ma-



terial de partida, se obtiene limpiando ampliamente la fracción proteínica previamente limpiada, en caso dado presente como precipitado salino, mediante amasado con poca agua de las partes salinas adherentes, el material proteínico sin disolver se separa por centrifugación y después se disuelve en agua y, si se desea, se dializa contra agua o una solución salina.

5. 22ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1ª-20ª, caracterizado porque la solución acuosa de la fracción proteínica empleada como material de partida se obtiene redializando la fracción proteínica previamente limpiada, salina, con agua y la solución contra agua o una solución salina o tampón al contenido salino deseado.

10. 23ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1ª-22ª, caracterizado porque la fracción proteínica obtenida se sigue limpiando, por ejemplo, por filtración, tal como filtración esterilizada.

15. 24ª.- "Procedimiento para la purificación de una proteína"; tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria, y dibujos adjuntos.

20. Esta Memoria consta de dieciseis hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

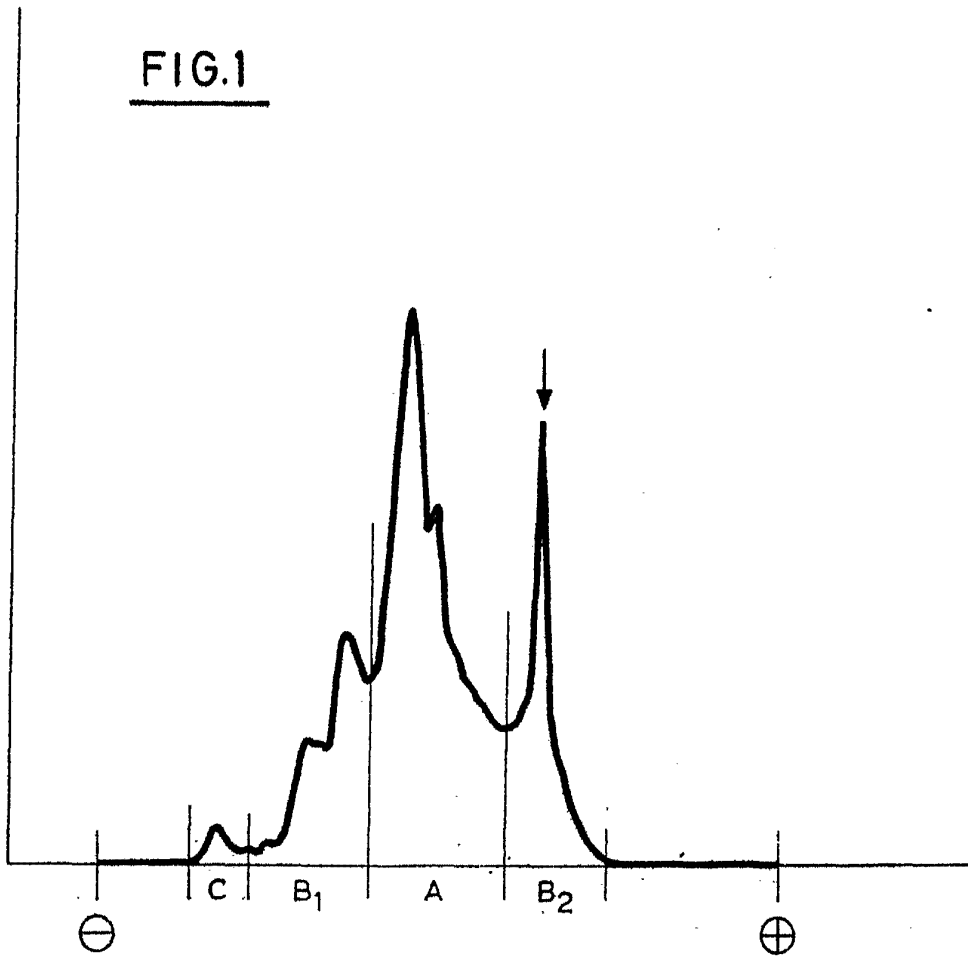
17 FEB 1966  
CIBA SOCIETE ANONYME,

J. GÓMEZ ACIBO Y MODET  
P. p. Firmador: F. Hernández Rula

17 FEB 1966

323176

FIG.1



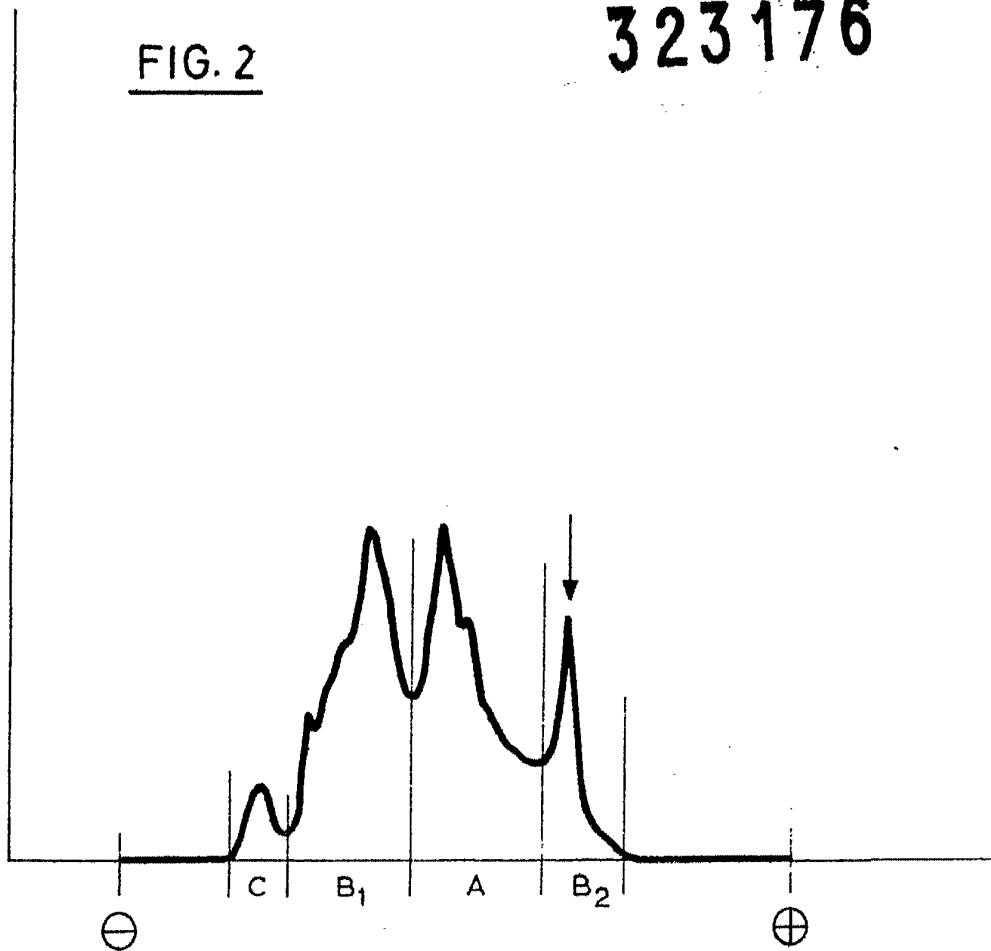
17 FEB 1966

323176

17 FEB 1960

FIG. 2

323176

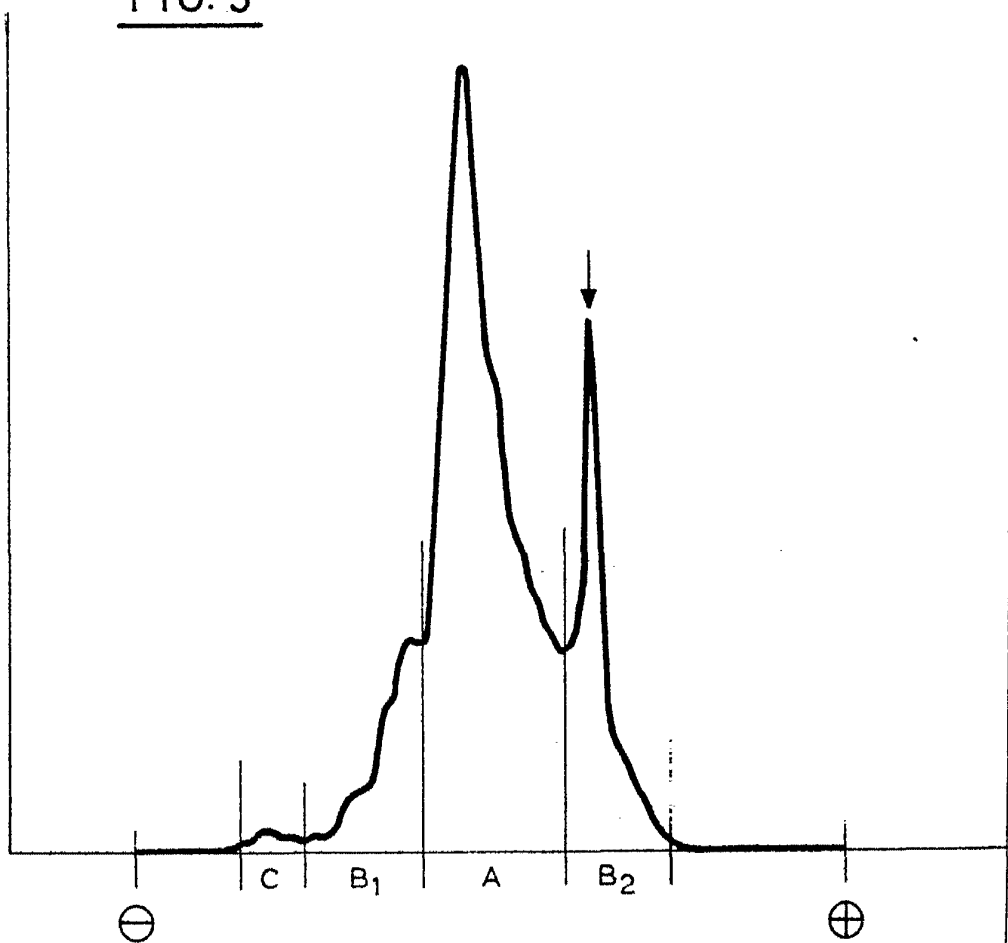


17 FEB. 1960



323176

FIG. 3

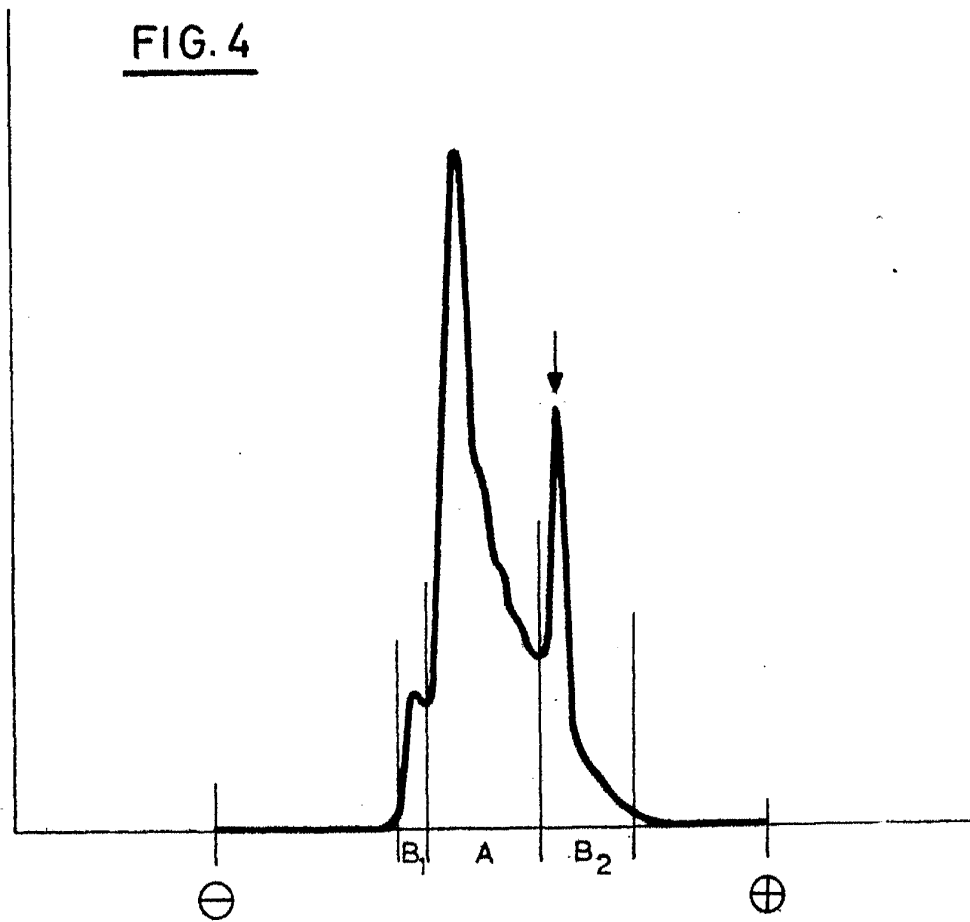


17 FEB. 1968



323176

FIG. 4



17. FEB. 1966