



437350

P.- 60.349  
DDI 23-30 - Div. I

A1 437350 761216 C07G 7/04

Cl. C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años  
a nombre de DIAGNOSTIC DATA, INC.

entidad norteamericana

establecida en 518 Logue Avenue, Mountain View, Califor-  
nia 94040, Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE ORGOTEINA  
A PARTIR DE UNA MEZCLA DE PROTEINAS SOLUBLES"

(Clase Internacional C07G)

26-5-75

- 1 -

**POOR  
QUALITY**



9/5

Esta invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de orgoteína.

La orgoteína define una familia de congéneres de proteína que poseen una combinación característica de propiedades físicas, químicas y farmacológicas. Cada uno de estos congéneres se caracteriza físicamente por ser la forma aislada, sustancialmente pura, de una proteína globular, soluble en tampón y en agua que tiene una conformación nativa altamente compacta, la cual, aunque inestable al calor, es estable al calentamiento durante varios minutos a 65°C en agua o en una solución tampón que contenga una sal de un metal divalente que tenga un radio iónico de 0,60 a 1,00 Å y que en la electroforesis en estado de gel a pH 8,45 en tampón de tris glicina 0,01 M da un espectro característico de bandas múltiples. Químicamente, cada uno de los congéneres se caracteriza por contener todos o todos menos uno de los aminoácidos esenciales, un pequeño porcentaje de hidratos de carbono, proporción nula de lípidos, de 0,1 a 1,0% de contenido de metales proporcionado por aproximadamente 3 a 5 átomos gramo por mol de uno o más metales divalentes en forma de quelato que tienen un radio iónico de 0,60 a 1,00 Å, y una proporción sustancialmente nula de metales monovalentes en forma de quelato o venenos celulares en la molécula. Farmacodinámicamente,



cada uno de los congéneres se caracteriza por ser una proteína inyectable, no tóxica e inmunológicamente bien tolerada, cuya actividad farmacológica incluye una actividad anti-inflamatoria que, al igual que su conformación compacta, está relacionada con su contenido en metales divalentes en forma de quelato. La afinidad inmunológica de un congénere de ergoteína es suficiente para permitir que sus anticuerpos preparados en el conejo o en otro animal adecuado reconozcan como antígeno a uno o más de otros congéneres de ergoteína y/o para que uno o más de los anticuerpos para otros congéneres de ergoteína lo reconozcan como antígeno, como se evidencia en la inmunoelectroforesis en estado de gel y/o inmunodifusión en estado de gel. Aunque algunas de las propiedades físicas y químicas y el tipo y grado de eficacia farmacodinámica de la ergoteína varían de congénere a congénere, todos los congéneres de ergoteína poseen la combinación de propiedades arriba indicada.

Sobre la base de datos bibliográficos recientes, es evidente actualmente que la familia ergoteínica de las metaloproteínas incluye las proteínas aisladas previamente en diversos estados de pureza a las que se han dado los nombres de hepatocupreína, Mann y Keilin, Proc. Royal. Sec. for Biol. Sci., 126, 303 (1939); cerebrocupreína, Porter y Ainsworth, J. Neurochem., 1,



260 (1957); eritrocupreína, Markowitz y otros, J. Biol. Chem., 234, 40 (1959); y citocupreína, Carrice y Deutsch, J. Biol. Chem., 244, 6087 (1969). Para otras referencias, véanse Mohamed y Greenberg, J. Gen. Physiol. 37, 433 (1954); Porter y Folch, Arch. Neurol. Psychiat. 77, 8 (1957); Porter y Ainsworth, J. Neurochem., 5, 91 (1959); Krimmel y otros, J. Biol. Chem., 234, 46 (1959); Wyman, Biochem. Biophys. Acta, 45, 387 (1960); Schields y otros, J. Clin. Inv., 40, 2007 (1961); Markowitz y otros, Anal. Chem., 33, 1594 (1961); Porter y otros, Arch. Biochem. Bioph., 105, 319 (1964); Stansell y Deutsch, J. Biol. Chem., 240, 4299 (1965); *ibid*, 240, 4306 (1965); Stansell y Deutsch, Clin. Chem. Acta, 14, 598 (1966); McCord y Fridovich, J. Biol. Chem., 243, 5753 (1968); McCord y Fridovich, J. Biol. Chem., 243, 6056 (1968); Hartz y Deutsch, J. Biol. Chem., 244, 4565 (1969); Carrice y Deutsch, *ibid*, 245, 723 (1970); Wood y otros, Eur. J. Biochem. 18 (1971) 187. Con estas observaciones, se ha hecho actualmente evidente que la familia de congéneres de la orgoteína incluye estas metaloproteínas; como la orgoteína posee una actividad pronunciada como superóxido-dismutasa, se ha establecido también su relación con la forma de este enzima en los mamíferos. Se ha informado que estas metaloproteínas poseen una actividad muy elevada como superóxido-dismuta-



sas (sodasas). Véanse McCord y Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049 (1969); Keele, McCord y Fridovich, J. Biol. Chem., 245, 6176 (1970); ibid, 246, 2875 (1971).

5 En la Patente de Bélgica 687.828 y en la Patente Británica 1.160.151 se describe un procedimiento de etapa múltiple para el aislamiento de proteínas a partir de tejidos animales, p.ej., del hígado de bovinos.

10 En la Patente de los EE.UU. 3.687.927 se describe un procedimiento mejorado para el aislamiento de ergoteína a partir del hígado y otros tejidos animales, que elimina varias etapas y aumenta sustancialmente el rendimiento.

15 En la Patente de los EE.UU. 3.579.495, se reivindica un procedimiento para el aislamiento de ergoteína a partir de glóbulos rojos de la sangre por un procedimiento de etapa múltiple que incluye una pre-purificación con disolvente para separar la hemoglobina y una etapa de calentamiento, en un rendimiento global de aproximadamente 0,01%, calculado sobre los glóbulos rojos compactados.

20

En algunas de las referencias bibliográficas citadas arriba, se utilizó una etapa de purificación cromatográfica con DEAE-celulosa como parte de un procedimiento de etapa múltiple para el aislamiento de la ergoteína a partir del hígado de buey y otros tejidos anima

25



les. En uno de estos procedimientos, de Carrico y otros,  
J.B.C., 244, 6087-6093 (1969), la mezcla de proteínas  
solubles extraídas se somete a tres purificaciones cro-  
matográficas, seguidas, en todos los casos, por diálisis  
5 y luego por una filtración en estado de gel con Sephadex  
G-75. Este procedimiento, si bien es aceptable en escala  
de laboratorio, no es práctico en una escala industrial.  
Además, el rendimiento global fue sólo de 0,0065%.

En otra de las referencias de bibliografía arri-  
10 ba citadas, se utilizó una etapa de purificación cromatográfica con DEAE-celulosa como parte de un procedimiento de etapa múltiple para aislar la ergoteína a partir de los glóbulos rojos de la sangre. En el más sencillo de estos procedimientos, los glóbulos rojos de la sangre  
15 se liberaron de hemoglobina por precipitación con disolvente y luego se fraccionó con  $K_2HPO_4$  y acetona. Una porción de las proteínas solubles fraccionadas se cromatografió a pH 7,4, produciéndose, a partir de 3 litros de glóbulos compactados 190 mg de ergoteína que tenía una  
20 actividad como superóxido-dismutasa de 3.300 unidades/mg (rendimiento global, 0,006%; 60% de recuperación de la ergoteína). Este procedimiento, si bien es aceptable en escala de laboratorio, no es factible en escala industrial. Por ejemplo, para producir 1 kilogramo de ergo-  
25 teína se requerirían más de 7.500 litros de cloroformo,



4.500 litros de etanol, 7.000 kg de  $K_2HPO_4$  y 5.000 litros de acetona, si el procedimiento hubiera de llevarse a escala mayor sin cambios.

5 En una etapa del procedimiento de esta invención, se eliminan proteínas extrañas a partir de una mezcla de proteínas que comprende orgoteína por un tratamiento enzimático sencillo de la mezcla. Los fragmentos de proteína resultantes se pueden eliminar fácilmente de la solución de orgoteína por diálisis.

10 En otra etapa del procedimiento de esta invención, la hemoglobina y la anhidrasa carbónica se eliminan de los glóbulos rojos de la sangre antes del aislamiento de las orgoteínas a partir de aquéllas por un  
15 tratamiento al calor de los glóbulos rojos de la sangre para obtener una solución que retiene la orgoteína pero que está sustancialmente exenta de hemoglobina y de anhidrasa carbónica. Una tal solución se puede someter a cromatografía empleando una columna cromatográfica mucho más pequeña que la que se requiere cuando se utilizan  
20 glóbulos rojos de la sangre destruidos por una lisina. Esto es particularmente cierto si la solución de partida se concentra antes de la cromatografía, lo cual no puede hacerse fácilmente con los glóbulos rojos de la sangre destruidos por una lisina. Además, debido a que  
25 menos del uno por ciento de las proteínas que se hacen



pasar a través de la columna cromatográfica cuando se emplean glóbulos rojos necesita ser sometido a cromatografía en la presente realización de esta invención con objeto de aislar la misma cantidad de ergoteína, la vida útil en la columna de la resina cromatográfica empleada es mucho mayor, los caudales son mejores y la selectividad de la resina es mayor, requiriendo así una elución regulada con menor exactitud. El procedimiento tiene la ventaja evidente sobre el de la Patente de los EE.UU. 3.579.495 de que la anhidrasa carbónica y la hemoglobina de los glóbulos rojos de la sangre, los cuales constituyen aproximadamente el 99% de las proteínas de los mismos, se separan simultáneamente sin el empleo de disolvente orgánico.

Se ha descubierto que, por la etapa cromatográfica del procedimiento de esta invención, el disolvente utilizado para separar la hemoglobina, el  $K_2HPO_4$  utilizado para separar la anhidrasa carbónica, y el disolvente utilizado para precipitar la ergoteína se pueden eliminar, haciendo el procedimiento extremadamente práctico en escala industrial.

En la etapa cromatográfica de esta invención, se puede aislar ergoteína sustancialmente pura con alto rendimiento a partir de glóbulos rojos de la sangre destruidos por una lisina en una etapa de purificación cro-



matográfica sencilla sin necesidad de una purificación  
previa o posterior con disolvente orgánico o con sal.  
La base de esta invención lo constituye el hecho de que,  
aunque la hemoglobina constituye al menos el 96% de las  
5 proteínas solubles en los glóbulos rojos de la sangre,  
y el 70% o más del resto de las proteínas está consti-  
tuido por la anhidrasa carbónica, ambas se pueden sepa-  
rar en la misma etapa en la que se aísla la orgoteína  
en forma sustancialmente pura. La simplicidad y la eco-  
10 nomía del presente procedimiento son tales que los cos-  
tes globales de producción y de materiales son aproxima-  
damente la décima parte de los costes mínimos que eran  
posibles hasta ahora en escala industrial. Igualmente  
sorprendente es el hecho de que estas enormes cantida-  
15 des de proteína indeseada no se fijan al adsorbente de  
columna empleado en este procedimiento, lo cual permite  
su fácil regeneración y reutilización.

Por el procedimiento de purificación cromato-  
gráfica de esta invención, se puede obtener orgoteína  
20 de pureza farmacéuticamente aceptable en una sola etapa  
de purificación cromatográfica, lo que hace que el pro-  
cedimiento sea extremadamente práctico en escala indus-  
trial.

La simplicidad y economía de todas y cada una  
25 de las realizaciones del presente procedimiento, son ta



les que los costes globales de producción y de materia  
les son aproximadamente la décima parte de los costes  
mínimos que eran posibles hasta ahora en escala indus-  
trial.

5                   La orgoteína se aísla a partir de una mezcla  
de proteínas solubles por al menos una de las etapas  
de:

10                   (I) someter una solución acuosa de una mezcla  
de proteínas que comprende orgoteína a la actividad en-  
zimática de un enzima proteolítico, degradando así se-  
lectivamente al menos una porción de las proteínas ex-  
trañas;

15                   (II) calentar al menos la porción de los gló-  
bulos rojos de la sangre integral a un pH comprendido  
entre 5 y 8, con lo que precipita la hemoglobina y a  
una temperatura de aproximadamente 60 a 80°C, enfriar  
la mezcla calentada, separar las proteínas precipitadas  
de la mezcla calentada, y separar la orgoteína del lí-  
quido que sobrenada; y

20                   (III) aislar orgoteína sustancialmente pura  
a partir de una fuente de la misma sometiendo una mez-  
cla de orgoteína y otras proteínas solubles en tampón  
a una separación cromatográfica, aplicando la mezcla  
de proteínas solubles en tampón en forma de una solu-  
25                   ción acuosa que tiene una concentración iónica menor de



aproximadamente 0,01 M a una columna cargada con una resina de intercambio de ion que tiene grupos débilmente básicos, adsorbiéndose de esta manera la orgoteína y una porción de las otras proteínas contenidas en la mezcla sobre la resina, eluyendo selectivamente las proteínas adsorbidas de la resina con un eluyente acuoso de concentración iónica mayor, y aislando la orgoteína a partir del producto de elución, y caracterizadas por el hecho de que:

(a) la separación cromatográfica se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6 y con una concentración iónica de hasta aproximadamente 0,01 M;

(b) una porción de las proteínas adsorbidas se eluye de la columna con un eluyente acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6 y una concentración iónica inferior a aproximadamente 0,02 M; y

(c) se aísla de la columna orgoteína sustancialmente pura como sigue:

(i) cuando la mezcla de proteínas solubles procede de tejidos animales, por elución de otra porción de las proteínas adsorbidas de la columna con un eluyente acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6 y una concentración iónica mayor, comprendida entre aproximadamente 0,02 M y aproximadamente 0,03 M mientras que se controla al menos una de las absorbancias  $A_{265}$



y  $A_{280}$  y se mide al menos uno de los contenidos en Cu y Zn del producto de la elución, y separando de la porción del producto de la elución que tiene una concentración iónica de aproximadamente 0,02 a 0,03 M la fracción que contiene la orgoteína que tiene el contenido máximo en metales divalentes no iónicos y la absorbancia mínima  $A_{265}$  ó  $A_{280}$ ; o bien

(ii) cuando la mezcla de proteínas solubles procede de los glóbulos rojos de la sangre e incluye la hemoglobina y la anhidrasa carbónica de los mismos, por lavado de la columna hasta dejarla exenta de hemoglobina y anhidrasa carbónica antes de eluir de aquélla la orgoteína.

#### I. TRATAMIENTO CON ENZIMAS PROTEOLITICAS

Sorprendentemente, para todos los fines prácticos la orgoteína es sustancialmente inerte a la degradación producida por las enzimas proteolíticas. Debido a este hecho, se puede emplear en el procedimiento de esta invención cualquier enzima proteolítica. Se incluyen exopeptidasas y endopeptidasas brutas o purificadas, y mezclas de las mismas que incluyen leucina-aminopeptidasas y otras aminopeptidasas, carboxipeptidasas A y B, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, quimotripsina B, aminopolipeptidasa, prolinasa, prolidasa, catepsi

nas, leucilpeptidasa, dipeptidasa, papaína, bromelina, ficina, asclepaína, mexicana, pomiferaína, plasmina, tetrahymena-proteinasa, proteinasa de B. subtilis, proteinasa de Ps. aeruginosa, proteinasa de Streptococcus, 5 proteinasa de Streptomyces griseus, p.eje., "Pronasa", etc., o extractos de tejidos parcialmente purificados, p.ej., pancreatina, o extractos de enzimas proteolíticas de bazo o de riñón.

Se prefieren la proteinasa de Streptomyces 10 griseus, la pancreatina, la subtilisina, la papaína, y la bromelina. De entre éstas, se prefiere especialmente la pancreatina, que es particularmente adecuada para eliminar grandes cantidades de impurezas de naturaleza proteínica. Las proteinasas purificadas, p.eje., "Prona- 15 sa", son especialmente apropiadas para eliminar pequeñas cantidades de proteínas residuales a partir de orgoteína sustancialmente pura.

Como será evidente, dado que las enzimas proteolíticas son ellas mismas proteínas, el presente procedimiento es inicialmente un "intercambio" de impurezas proteínicas. No obstante, las enzimas son en general auto-degradantes y se pueden separar por consiguiente 20 fácilmente de la orgoteína, p.ej., por diálisis, o bien tienen propiedades de carga o tamaño que permiten su fácil separación. Además, la proporción en peso de en- 25



zima empleado a proteínas degradadas proteolíticamente en la mezcla de proteínas es usualmente menor de uno. Véase Chance, *Advanc. Enzimol.*, 12, 153, 171, (1951). Por tanto, el efecto neto consiste en una  
5 conversión sustancial o completa de las proteínas extrañas procedentes de la mezcla de proteínas de partida en fragmentos de peso molecular bajo en tanto que se conserva sin alteración la orgoteína.

Un medio para evitar este "intercambio" de  
10 impurezas proteínicas consiste en emplear una enzima insolubilizada, p.ej., pancreatina o una proteinasa, por acoplamiento con un soporte insoluble. Véase Emery, A.N. y Kent, C.A., *Birmingham Univ. Chem. Eng.*, 21, 71-76 (1970).

15 El procedimiento de esta invención puede emplear mezclas de proteínas solubles que contengan cualquier proporción de orgoteína, con inclusión de aquellas que contienen menos de 5% y preferiblemente menos de 1% de orgoteína, p.ej., la mezcla total de proteínas  
20 solubles extraída de una fuente de orgoteína, p.ej., glóbulos rojos de la sangre o tejidos, p.ej., tejidos de hígado, de músculos estriados, de riñón, de músculos de corazón, de los pulmones y de los intestinos; extractos parcialmente purificados, p.ej., aquéllos que contienen, p.ej., de 5 a 50% de orgoteína; y los que están  
25



constituidos predominantemente, es decir, en una proporción superior al 50%, por orgoteína, con inclusión de orgoteína parcialmente purificada y orgoteína sustancialmente pura, p.ej., de 90% ó de pureza mayor. Así,  
5 el procedimiento de esta invención se puede emplear como parte de un procedimiento para el aislamiento de orgoteína o para eliminar cantidades traza de impurezas proteínicas a partir de orgoteína sustancialmente pura, ya aislada. En un aspecto preferido, el procedimiento  
10 de esta invención emplea como material de partida la solución acuosa de proteínas solubles que comprende orgoteína extraída de una fuente de la misma, preferiblemente de hígado, y lo más preferiblemente, de hígado de buey. En otro aspecto preferido, se utiliza para aislar  
15 orgoteína a partir de una mezcla de proteínas enriquecida en orgoteína, esto es, para purificar orgoteína parcialmente aislada a partir de un extracto de sangre o de tejidos, p.ej., de hígado o de eritrocitos, que se ha calentado para precipitar las proteínas termolábiles.  
20 les.

En un aspecto preferido de esta invención, debido a su eficiencia, se emplea el tratamiento enzimático para eliminar una mayor parte, preferiblemente al menos 80% de las proteínas extrañas a partir de una  
25 mezcla de proteínas que contenga solamente un porcenta



je muy pequeño de orgoteína, es decir, menor del 5%,  
p.ej., aproximadamente de 0,01% a 1%. Ejemplos de ta-  
les mezclas son las proteínas totales solubles extraídas  
de una fuente de orgoteína, p.ej., de los glóbulos ro-  
5 jos de la sangre, de los riñones y preferiblemente del  
hígado, en especial del hígado de buey.

Un aspecto económicamente importante de esta  
invención deriva del empleo más efectivo de los procedi-  
mientos cromatográficos subsiguientes. Sin pre-fraccio-  
10 namiento, sólo se pueden separar por cromatografía apro-  
ximadamente 4 equivalentes-gramo de proteínas solubles  
de hígado sobre 1 ml de DEAE-celulosa. Después de pre-  
digestión con proteasas, esta cantidad se puede aumen-  
tar 5 ó 10 veces, como mínimo.

15 Para una descripción de los métodos de extrac-  
ción de una mezcla de proteínas solubles que comprende  
orgoteína a partir de fuentes naturales de las mismas  
y aislamiento de orgoteína sustancialmente pura a par-  
tir de aquéllas, véanse, p.ej., la Patente Británica  
20 1.160.151 y las Patentes de los EE.UU. 3.579.495 y  
3.637.640.

En una realización especialmente preferida,  
las proteínas solubles son aquéllas que quedan después  
de un tratamiento por el calor de la mezcla total de  
25 proteínas solubles extraídas, p.ej., a 60-80°C, por



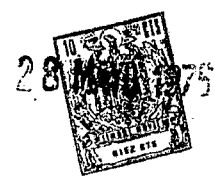
ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. 3.624.251 ó en la Patente de los EE.UU. 3.579.495.

5 La mezcla de partida de proteínas que comprende orgoteína se somete a la acción enzimática de la encima proteolítica seleccionada en condiciones cualesquiera de pH, temperatura, tiempo y proporción de proteínas a enzima que sean útiles para la enzima seleccionada. Estas condiciones son bien conocidas en la técnica.

10 La mezcla de partida de proteínas se puede emplear en cualquier disolvente acuoso en el que la orgoteína sea soluble y estable. Preferiblemente se emplea un tampón, p.ej., de pH 1 a 13, preferiblemente de pH 4 a 10, p.ej., de pH 5 a 6 ó aproximadamente de pH 7,5, que contenga deseablemente una pequeña cantidad de uno o más metales divalentes que tengan un radio iónico comprendido entre 0,65 y 1,00 Å, p.ej., Co, Cu, Fe, Ge, Mg, Ni, Zn, Mn ó Ca, y que tengan preferiblemente una concentración iónica menor de 0,1 M.

20 La mezcla de proteínas que comprende orgoteína se puede emplear en cualquier concentración conveniente en el disolvente acuoso seleccionado, p.ej., desde una concentración tan baja como 0,01% hasta 10% ó superior. La solución tiene preferiblemente una concentración iónica de 0,001 M a 0,1 M, la cual se puede

25



proporcionar por medio de una sal, p.ej., NaCl, o de un tampón, p.ej., tris, tris-glicina-fosfato, y deseablemente contiene uno o más metales divalentes que tengan un radio iónico de 0,65 a 1,00 Å, p.ej., Mn, Cu, Zn y/o

5 Mg.

La degradación enzimática se lleva a cabo usualmente a aproximadamente 20-40°C. Sin embargo, se pueden emplear temperaturas más bajas y más altas, p.ej., de 0 a 60°C, dependiendo la temperatura óptima de la actividad y estabilidad de la enzima seleccionada.

La proporción de enzima a mezcla de partida de proteínas depende principalmente de la proporción de orgoteína a proteínas extrañas en la mezcla de partida, esto es, que cuanto mayor sea la proporción de proteínas extrañas en la mezcla de partida, tanto mayor será la cantidad de enzima requerida. La cantidad de enzima depende también de la actividad de la enzima seleccionada. La proporción óptima se puede calcular a partir de la actividad proteolítica conocida de la enzima y de la cantidad de proteínas extrañas que se desee degradar contenidas en la mezcla, y generalmente es independiente de la concentración de la orgoteína en aquella. Usualmente se emplea una proporción en peso de enzima a mezcla de partida de proteínas menor de 1, p.ej., de 1:2 hasta 1:1000 dependiendo la proporción exacta, como se



ha indicado arriba, de la actividad enzimática de la enzima seleccionada y de la proporción de proteínas extrañas en la mezcla.

5 La orgoteína así purificada se puede aislar o purificar adicionalmente de una diversidad de maneras. Las proteínas degradadas proteolíticamente, tanto si son oligopéptidos como si son aminoácidos, se separan fácilmente de la orgoteína así purificada, p.ej., por uno o más de entre los procedimientos de intercambio de ion o cromatografía en estado de gel, precipitación fraccionada con disolventes o con sulfato amónico, y/o por ultrafiltración o diálisis a través de membranas, preferiblemente al menos el último procedimiento por ser rápido, eficiente y de coste reducido.

10

15 Si quedan impurezas proteínicas, las mismas se pueden separar, preferiblemente después de diálisis para eliminar las proteínas degradadas proteolíticamente, por adsorción en una columna de intercambio de ion débilmente básica y posterior elución de la misma, p. ej., de la manera descrita en los ejemplos que se dan más adelante en esta memoria. Otras técnicas que se pueden utilizar son cromatografía de filtración en estado de gel; precipitación fraccionada con disolvente, p.ej., acetona o etanol, o con sulfato amónico; y calentamiento, p.ej., a 70-75°C, como se describe en los ejemplos

20

25



que se dan más adelante en esta memoria para precipitar las impurezas proteínicas remanentes.

## II. TRATAMIENTO TERMICO

5                   Es sorprendente que tanto la hemoglobina como la anhidrasa carbónica se puedan precipitar selectivamente de manera sustancialmente completa mientras que se mantiene la orgoteína en solución, debido a la gran proporción, esto es, al menos 95%, de proteínas de par-  
10                   tida que se precipitan. Asimismo, la hemoglobina es una proteína relativamente estable al calor, Además, el calentamiento no la insolubiliza o la insolubiliza sólo parcialmente fuera del margen de pH empleado en el procedimiento de esta invención.

15                   En una realización preferida, el procedimiento de esta invención comprende las etapas siguientes:

(1) Diluir sangre integral (entera) con hasta aproximadamente 3, p.ej., de 0,5 a 1,5, volúmenes de agua;

20                   (2) calentar la sangre integral a aproximadamente 65-75°C durante aproximadamente 1 hora a 8 horas;

(3) enfriar la mezcla calentada, preferiblemente a al menos 40°C, y más preferiblemente a la temperatura ambiente o inferior;  
25



1975

(4) separar las proteínas precipitadas, preferiblemente por centrifugación; y

(5) separar la orgoteína bruta del líquido que sobrenada, preferiblemente por cromatografía con  
5 resinas de intercambio de ion.

En otras realizaciones, se emplean una o más de las siguientes variaciones de esta realización preferida:

(a) En la etapa (1), se emplean como material de partida para la etapa de calentamiento glóbulos de la sangre exentos de suero, preferiblemente sus  
10 pendidos en 1 a 3 volúmenes de agua;

(b) el calentamiento se lleva a cabo a una temperatura más baja durante un período de tiempo más  
15 largo, p.ej., a 60°C durante 3 ó más horas, o a una temperatura más alta durante un período de tiempo más corto, p.ej., a 80°C durante 30 minutos a una hora;

(c) el calentamiento se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7;

(d) la etapa (3) se lleva a cabo después de la etapa (4) o durante la misma;

(e) la orgoteína se aísla del líquido que sobrenada en la etapa (5) por precipitación con acetona u otro disolvente orgánico miscible con el agua;

(f) la orgoteína se aísla del líquido que so  
25



brenada en la etapa (5) por ultrafiltración o por liofilización;

(g) una porción del agua se separa del líquido que sobrenada antes del aislamiento de la orgoteína por destilación a vacío, p.ej., a 20-60°C.

La etapa de calentamiento se puede llevar a cabo sobre sangre integral, lo que se prefiere, debido a que se eliminan las etapas mecánicas de separación del suero y lavado de los glóbulos rojos de la sangre compactados. Se puede llevar a cabo también sobre los glóbulos rojos de la sangre exentos de suero. Este último produce orgoteína algo más pura, pero esta ventaja se ve contrarrestada por el coste de separación y lavado de los glóbulos rojos antes del calentamiento. Además, las impurezas proteínicas adicionales se pueden separar con un trabajo adicional mínimo por medio de una enzima proteolítica como se describe más adelante en esta memoria. Por consiguiente, la sangre integral es el material de partida preferido.

Aun cuando la etapa de calentamiento se puede realizar sobre sangre integral sin diluir o sobre glóbulos rojos compactados exentos de suero, el hacerlo así lleva implicados problemas mecánicos de mezclado e intercambio de calor. Por esta razón, la sangre integral y especialmente los glóbulos rojos exentos de suero se



mezclan preferiblemente con agua, p.ej., hasta aproximadamente con 3, y preferiblemente aproximadamente con 1 a 2 volúmenes, antes del calentamiento. El agua puede, si se desea, contener un agente tampón y/o una fuente de ion metálico divalente, p.ej., Cu y/o Zn, deseablemente en concentraciones relativamente bajas, p.ej., inferiores a 0,05 M. Cuando se utiliza sangre integral, se puede añadir citrato trisódico u otro inhibidor de coagulación para evitar la coagulación antes de la descomposición de la hemoglobina.

La etapa de calentamiento se lleva a cabo con preferencia aproximadamente en el punto isoeléctrico de la hemoglobina de los glóbulos rojos, o sea, aproximadamente a pH 7. El pH isoeléctrico de diversas hemoglobinas está comprendido dentro del margen de 6,5 a 7,5, usualmente de 6,7 a 7,4. A un pH bajo, p.ej., inferior a 5, la hemoglobina se desnaturaliza pero sólo precipita parcialmente. La hemoglobina de algunas especies animales, p.ej., de bovinos y equinos, precipita a todos los valores de pH comprendidos dentro del margen de 5 a 8. Otras hemoglobinas precipitan sólo aproximadamente en su punto isoeléctrico.

El pH de los glóbulos rojos se puede ajustar con cualquier ácido o base adecuados.

La etapa de calentamiento se lleva a cabo a



aproximadamente 60 a 60°C, preferiblemente a aproximada-  
mente 70-75°C, hasta que ha precipitado toda o prácti-  
camente toda la hemoglobina. La temperatura y el tiempo  
exactos no son críticos, con tal que la hemoglobina  
5 precipite de manera sustancialmente completa. Temperatu-  
ras más altas y tiempos de calentamiento más largos per-  
judican el rendimiento global en orgoteína. Temperatu-  
ras más bajas y tiempos de calentamiento más cortos pro-  
ducen una orgoteína menos pura. A aproximadamente 75°C,  
10 son suficientes de 1 a 2 horas aproximadamente. El ca-  
lentamiento durante una hora o incluso por más tiempo  
a 60-75°C no afecta de manera importante al rendimiento  
final en orgoteína pura. En cambio, el calentamiento a  
80°C durante una hora destruye aproximadamente de una  
15 cuarta parte a las tres cuartas partes de la orgoteína.  
La etapa de calentamiento se puede llevar a cabo por  
cargas o bien, mediante el empleo de zonas alargadas  
de calentamiento y enfriamiento, de manera continua.

Las proteínas inestables al calor, con inclu-  
20 sión de las enzimas, se separan de los glóbulos rojos  
de la sangre por desnaturalización al calor junto con  
la hemoglobina. La anhidrasa carbónica es un componen-  
te destacado de tales proteínas inestables al calor.  
Los glóbulos rojos se calientan hasta que se inactiva  
25 la anhidrasa carbónica. Para una revisión de la sensi-



bilidad de la anhidrasa carbónica al calor, véase R.P. Davis, The Enzymes, Vol. 5, 545 (1961). Academic Press, ciudad de Nueva York.

5 Una vez que ha precipitado la hemoglobina, ha  
brán precipitado también la anhidrasa carbónica y to-  
das o casi todas las restantes enzimas y proteínas no  
enzimáticas inestables al calor existentes en el líqui-  
do que sobrenada, dado que la hemoglobina es más esta-  
ble. Por ejemplo, a 60°C, se requiere usualmente un tiem-  
10 po de calentamiento más largo de 20 minutos para inacti  
var la anhidrasa carbónica y las restantes proteínas  
inestables al calor, y a 65°C es suficiente con 10 a  
15 minutos.

15 La finalización de la precipitación de la he-  
moglobina se puede comprobar fácilmente por el color  
del líquido que sobrenada, que debería ser como máxi-  
mo un rosa pálido.

Ocasionalmente, con sangre envejecida, es pe-  
sible que no precipite la totalidad del color rojo de  
20 la hemoglobina si la etapa de calentamiento se conduce  
a un pH ácido. Si sucede esto antes o después de la se-  
paración de la hemoglobina precipitada por la etapa de  
calentamiento, cualquier color residual se puede preci-  
pitar ajustando el pH a 7 ó por encima de 7, preferible-  
25 mente entre 7 y 7,5, antes de la precipitación de la or-



goteína, p.ej., antes o después de la separación de la hemoglobina precipitada, p.ej., como parte de la precipitación previa de proteínas extrañas con acetona. El color rojo precipitado se puede separar de la misma manera que la hemoglobina precipitada en la etapa de calentamiento.

Después del calentamiento, los glóbulos rojos calentados se enfrían hasta una temperatura inferior a aproximadamente 50°C, preferiblemente a la temperatura ambiente o más fría, p.ej., por paso a través de un cambiador de calor.

La hemoglobina y otras proteínas precipitadas en la etapa de calentamiento se separan luego, preferiblemente por centrifugación, y se desechan. Se puede emplear también sedimentación o filtración, preferiblemente filtración a vacío con coadyuvantes de filtración, p.ej., tierra de diatomeas.

Después de la separación de la hemoglobina precipitada, se separa la ergoteína del líquido que sobrenada, p.ej., por adición de acetona a la solución enfriada, por liofilización, por ultrafiltración, o por adsorción en una columna de resina de intercambio de ion y posterior elución de la misma.

Un método preferido para la separación de la ergoteína del líquido que sobrenada es por cromatogra-



fía de cambio de ion, p.ej., empleando las técnicas des-  
critas en la solicitud de Patente de EE.UU. 205.610 ó  
en la Patente de los EE.UU. 3.579.495, cuyas descripcio-  
nes se incorporan como referencia.

5                   Un método especialmente preferido que es fá-  
cilmente adaptable para partidas de producción de orgo-  
teína consiste en hacer pasar el líquido sobrenadante  
obtenido en la etapa de calentamiento a través de una  
columna de intercambio de ion cargada con DEAE-celulosa  
10                   o similar, como se describe en la solicitud de patente  
de EE.UU. Núm. de Serie 205.610. En tal etapa, el lí-  
quido que sobrenada, que tiene una concentración ióni-  
ca inferior a 0,01 M, se hace pasar a través de una co-  
luna de intercambio de ion cargada con DEAE-celulosa  
15                   u otra carga débilmente básica, adsorbiéndose de este  
modo la orgoteína sobre la resina de intercambio de ion;  
se lava luego la columna con agua o con un tampón que  
tenga una concentración iónica menor que aproximadamen-  
te 0,01 M; y se eluye la orgoteína a una concentración  
20                   iónica mayor, p.ej., de aproximadamente 0,02 a aproxima-  
damente 0,03 M. Dependiendo de las condiciones empleadas,  
se puede eluir de la columna desde orgoteína bruta, p.  
ej., de 50% de pureza, hasta orgoteína de alta pureza.

25                   Alternativamente, el líquido que sobrenada se  
puede purificar por cromatografía con tamices molecula-



res, p.ej., haciéndolo pasar a través de una columna de resina de dextrana reticulada con epíclorhidrina (Sephadex G-75 Superfino. Farmacia, Suecia). En un modelo de producción, la cabeza de la columna es reemplazable de tal manera que cuando la porción superior de la columna ha adsorbido orgoteína en la cuantía permitida por su capacidad, se retira la porción de la cabeza y se reemplaza con resina de nueva aportación, dejando intacto el resto de la columna.

10 El líquido sobrenadante se puede pre-purificar antes del aislamiento de la orgoteína a partir del mismo por la adición a aquél de una enzima proteolítica como se reivindica en la solicitud de patente de los mismos inventores presentada en la misma fecha de la presente invención, Solicitud de patente de EE.UU. Núm. 15 de Serie 273.278, presentada el 19 de julio de 1972, que lleva el título "Tratamiento Enzimático de Mezclas de proteínas que Contienen Orgoteína". Sorprendentemente, para todos los fines prácticos, la orgoteína es sustancialmente inerte a la degradación por las enzimas proteolíticas. Así, la orgoteína bruta contenida en el líquido que sobrenada puede purificarse por digestión selectiva de las proteínas extrañas, preferiblemente con 20 proteínasa de *Strep. griseus*, pancreatina, subtilisina, 25 papaína o bromelina, en una proporción en peso de en-



zima a proteínas en el líquido que sobrenada de aproximadamente 1:2 a 1:1000, dependiendo de la enzima seleccionada y de la proporción de proteínas extrañas a orgoteína en la mezcla. Se puede aislar orgoteína pura o sustancialmente pura a partir de la mezcla digerida de una manera convencional, p.ej., por ultrafiltración. Los fragmentos de proteínas de la digestión enzimática y el exceso de iones se pueden separar convenientemente de la mezcla digerida por diálisis antes del aislamiento de la orgoteína de aquélla.

Si se desea separar la orgoteína del líquido que sobrenada en una sola etapa, se puede precipitar del mismo con acetona. Aproximadamente de 1 a 1,5 volúmenes de acetona, calculados con referencia al volumen del líquido que contiene la orgoteína, son suficientes para precipitar la totalidad de la orgoteína. Orgoteína de mayor pureza, p.ej., de pureza aproximada del 50% ó superior, se puede obtener algunas veces en el procedimiento de esta invención por precipitación previa de una porción de las proteínas disueltas con acetona. Si se emplea menos que un volumen igual de acetona, p.ej., de 0,5 a 0,75 volúmenes, se precipita con las proteínas extrañas una proporción muy pequeña, si acaso, de orgoteína. Después de la separación de las proteínas extrañas precipitadas, p.ej., de la manera

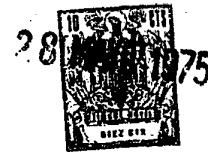


descrita arriba para la separación de la hemoglobina precipitada, la orgoteína se precipita después con el resto de la acetona, p.ej., de 0,75 a 1,5 volúmenes, calculado con referencia a la solución acuosa. No obstante, esta etapa de precipitación previa con disolvente precipita una proporción muy pequeña de impurezas proteínicas si la etapa de calentamiento se llevó a cabo a 75<sup>o</sup>-80<sup>o</sup> durante 1 a 2 horas a pH 7,0, debido al acabado de la precipitación en la etapa de calentamiento.

La precipitación previa de las proteínas extrañas y la orgoteína se lleva a cabo preferiblemente en frío, p.ej., entre 0 y 5<sup>o</sup>C. No obstante, se puede emplear cualquier temperatura, p.ej., desde la temperatura ambiente, hasta el punto de ebullición de la acetona.

Se emplea acetona en el procedimiento de esta invención por razones de economía. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden emplear también otros disolventes miscibles con el agua de precio más alto para precipitar la orgoteína, p.ej., metil-etil-cetona y tetrahidrofurano, los cuales son los equivalentes funcionales de la acetona en el procedimiento de esta invención.

La orgoteína precipitada debería liberarse de



5 disolvente y humedad residuales lo más pronto posible, p.ej., por secado por congelación y liofilización, o por redisolución en un vehículo acuoso para su purificación ulterior, a fin de evitar pérdidas de orgoteína.

10 Aunque se puede obtener un precipitado rico en orgoteína exenta de hemoglobina y anhídrido carbónico por la técnica de precipitación con acetona, el líquido sobrenadante exento de hemoglobina es eminentemente adecuado para purificación cromatográfica con tamices moleculares o por intercambio de ion en condiciones débilmente básicas, p.ej., de la manera descrita en la patente de los EE.UU. 3.579.495. En situaciones en las que sea inconveniente el tratamiento por 15 cromatografía de volúmenes grandes de líquido, se puede concentrar este líquido sobrenadante exento de hemoglobina antes de la cromatografía por ultrafiltración o secado por congelación. Puede emplearse también la adsorción por cargas de la orgoteína en cambiadores de 20 iones débilmente básicos.

III. CROMATOGRAFIA

25 El material de partida para la etapa de cromatografía del procedimiento de esta invención es, o bien una mezcla de proteínas solubles en tampón extraí



1975

das de tejidos animales, o las proteínas solubles de los glóbulos rojos de la sangre, incluyendo tanto la hemoglobina como la anhidrasa carbónica.

5 El término "tejidos animales", tal como se utiliza en esta memoria, significa cualquier órgano, músculo o tejido afín. Se excluye la sangre y cualquier fracción de la misma, la cual tiene una proporción muy superior de otras proteínas solubles que de orgoteína, a saber, hemoglobina y anhidrasa carbónica, y por consiguiente requiere técnicas diferentes para su separación. De los tejidos animales se prefiere el hígado, en especial el hígado de bovinos, ya que éste posee una alta concentración de orgoteína. Otros tejidos que pueden utilizarse son los de riñones, corazón, cerebro, bazo, vísceras, músculos, testículos, glándulas  
15 cervicales, pulmones, lengua, timo y páncreas. Ejemplos de especies preferidas de animales cuyos tejidos se pueden emplear como fuente de mezclas de proteínas solubles en tampón son los bovinos, gallináceas, porcinos y equinos. Otros son ovejas, cabras, conejos, perros, ratas, seres humanos, etc. Se prefieren las proteínas solubles de tejidos de bovinos.  
20

La mezcla de partida de proteínas solubles en tampón que contienen orgoteína se puede obtener mezclando perfectamente el tejido animal con el medio de  
25



extracción acuoso seleccionado. Para separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles, el tejido debe picarse tan finamente como sea posible. Por ejemplo, el tejido se puede triturar previamente para formar una pulpa en un triturador de carne y puede mezclarse después perfectamente con el líquido de extracción seleccionado, p.ej., en un equipo de mezclado de alta velocidad.

La proporción de medio de extracción a tejido animal no es crítica y viene dictada fundamentalmente por las características físicas de manipulación de la mezcla. Una proporción muy baja reduce un tanto el rendimiento de orgoteína extraída del tejido y produce una mezcla semejante a un lodo que resulta difícil de separar, y la fase líquida retiene cantidades excesivas de materia coloidal que tiende a obstruir la columna cromatográfica. Una proporción muy elevada no presenta ventaja alguna y da como resultado una solución diluida de proteínas extraídas que es más difícil de manipular debido a su volumen.

Generalmente, se emplea una proporción en volumen de medio de extracción a tejido animal comprendida entre aproximadamente 2:1 y 4:1, preferiblemente entre aproximadamente 2,3:1 y 2,8:1.

El medio de extracción puede ser agua, una



mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible,  
p.ej., acetona, metanol, etanol, preferiblemente una  
solución tampón de concentración iónica relativamen-  
te baja, p.ej., de 0,01 a 0,05 M, preferiblemente de  
5 aproximadamente 0,02 a 0,03 M. Aunque el medio de ex-  
tracción puede encontrarse virtualmente a cualquier  
pH, p.ej., de aproximadamente 4 a 9, se prefiere un  
pH ligeramente alcalino, p.ej., entre 7 y 9, preferi-  
blemente de aproximadamente 7,5 a 7,8, en especial  
10 cuando el tejido animal es tejido de hígado.

Cuando se emplea una solución tampón como  
medio de extracción para tejidos animales o como di-  
luyente para los glóbulos rojos descompuestos, el tam-  
pón puede ser cualquiera que proporcione el pH selec-  
15 cionado. Son ejemplos las sales de ácido fosfórico,  
ácido bórico, ácido cacodílico, ácido cítrico, ácido  
acético, ácido succínico, ácido maleico, colidina-HCl,  
tris-glicina-HCl, etc. Véase también J. Gomori, "Me-  
thods in Enzymology" ("Métodos en Enzimología"), Vol.  
20 I, págs. 136-146 (1955), en especial los tampones  
Núms. 5 a 8 y 10 a 18. Un tampón preferido, en espe-  
cial cuando se extrae tejido del hígado, es el tampón  
de tris-glicina, de pH 7,5.

El tampón puede contener también otras sales  
25 y otras materias para alterar sus características de



extracción. Se pueden emplear NaCl, KCl,  $MnSO_4$  u otra  
sal no formadora de tampón para aumentar la concentra-  
ción iónica del medio de extracción. Un sacárido so-  
luble, p.ej., glucosa, sacarosa, etc., se puede añadir  
5 también para facilitar la extracción al hacer más se-  
lectivo el tampón.

La mezcla de partículas de tejido suspendi-  
das y extracto acuoso se separa por cualquier medio  
conveniente, p.ej., filtración a presión o a vacío,  
10 o centrifugación, preferiblemente ésta última. El ex-  
tracto puede, si se desea, clarificarse después por  
filtración a través de un coadyuvante de filtración  
o por cualquier otro método convencional.

En el procedimiento de esta invención se  
15 pueden emplear las proteínas solubles de los glóbulos  
rojos de la sangre de una gran diversidad de especies.  
Básicamente, aquéllas que son utilizables contienen  
orgoteína que tiene un punto isoeléctrico que difiere  
del de la anhidrasa carbónica contenida en la mez-  
20 cla al menos en aproximadamente una unidad de pH. Se  
prefieren proteínas solubles de glóbulos rojos que  
contengan orgoteína que tenga un punto isoeléctrico  
de aproximadamente 4,5 a 5,5. Son ejemplos los glóbu-  
los rojos de bovinos, pollos y seres humanos. Otros  
25 son los de conejo, mono, rata, etc. Son sumamente pre-



feridas las proteínas solubles de los glóbulos rojos de la sangre de bovinos.

Los glóbulos rojos, que por término medio constituyen aproximadamente 35 a 45% en volumen y aproximadamente 39 a 50% en peso de la sangre total de muchos mamíferos, se separan del plasma de la sangre por centrifugación, aun cuando será suficiente la acción de la gravedad por sí sola. El lavado de los glóbulos separados y la re-centrifugación eliminan el plasma residual adherido a los glóbulos compactados. Se puede utilizar una solución salina o un tampón, que tengan una osmolaridad suficiente para evitar el riesgo de una descomposición prematura.

Un método especialmente preferido de descomposición es el basado en la sonificación, esto es, en la rotura de los glóbulos rojos con ultrasonidos. Este procedimiento tiene la ventaja de que no aumenta de modo importante el volumen de la solución de partida de proteínas y no introduce sales o compuestos orgánicos extraños en la solución de proteínas de partida.

Después de la separación de los componentes insolubles de los glóbulos, que constituyen aproximadamente 2% en peso de los glóbulos compactados, se pone en contacto una solución de las proteínas solubles de los glóbulos rojos descompuestos con el adsorbente cro



matográfico con el fin de adsorber la orgoteína en el mismo.

Si el extracto separado o la mezcla diluida de glóbulos rojos tiene una concentración iónica mayor de aproximadamente 0,01 M, será necesario reducir su concentración iónica con objeto de asegurar una adsorción preferente de la orgoteína sobre la resina de intercambio de ion. Esto se consigue de modo sumamente conveniente por dilución o por diálisis, p.ej., contra agua o preferiblemente contra un tampón de baja concentración iónica, el cual será, de manera sumamente preferible, el mismo tampón que se empleará en la separación cromatográfica, p.ej., fosfato.

Debido a que las sales disueltas afectan acusadamente a la susceptibilidad de adsorción de la orgoteína sobre el adsorbente cromatográfico, la solución de partida de proteínas solubles para la etapa cromatográfica debería tener una baja concentración iónica, es decir, menor de aproximadamente 0,01 M, p.ej., de 0,001 a 0,005 M. Si la solución tiene una concentración iónica mayor, puede reducirse fácilmente la misma por dilución o por simple diálisis a través de una membrana contra agua o contra una solución tampón de concentración iónica aproximadamente  $1-5 \times 10^{-3}$  M, preferiblemente el mismo tampón a utilizar en la separación cromatográfica.



1975

matográfica, p.ej., fosfato.

La naturaleza exacta de la sal que proporciona la concentración iónica a la solución de partida no es crítica. Se prefieren las sales de fosfato porque  
5 el pH deseado de aproximadamente 6 se puede mantener fácilmente con este tampón a la baja concentración iónica deseada. Otras sales son las de ácido bórico, ácido cacodílico, ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico, ácido maleico, colidina-HCl, tris-glicina-  
10 HCl, etc. Véase también J. Gomori, "Methods in Enzymology" ("Métodos en Enzimología"). Vol. I, págs. 136-146 (1955), en especial los tampones Núm. 5-8 y 10-18.

El procedimiento de esta invención se lleva  
15 a cabo preferiblemente durante toda su duración a un pH de aproximadamente 6, es decir, de 5,7 a 6,3, con inclusión de la etapa de adsorción de la orgoteína sobre el adsorbente cromatográfico. Sin embargo, es la etapa de elución selectiva, más que la etapa de adsor  
20 ción, aquélla cuya operabilidad es dependiente del pH. Por consiguiente, aun cuando no se prefiere, la solución de partida de proteínas solubles puede tener un pH algo más alto o algo más bajo, p.ej., de 4 a 8. En tal caso, el adsorbente cromatográfico debería equili  
25 brarse entonces antes de la carga de la muestra y des



pués de ello al pH de elución de aproximadamente 6, antes de llevar a cabo la elución selectiva de la or-goteína a partir de aquélla.

El adsorbente cromatográfico empleado en el  
5 procedimiento de esta invención es una resina de in-tercambio de ion que tiene grupos débilmente básicos que poseen atracción por los iones ácidos. Son ejem-plos las conocidas resinas de intercambio de ion de  
10 celulosa y polisacárido, con inclusión de las alcohol-amino inferior-alcohol inferior-celulosas, p.ej., die-tilamino-etil-celulosa (DEAE), trietil-aminoetil-celu-losa (TEAE), dietilaminoetil-Sephadex y QAE-Sephadex  
(resina de dextrana reticulada aminoetilada cuaterna-ria). Tales resinas tienen en general una capacidad ad-  
15 sorbente comprendida entre aproximadamente 1,0 y 5 mi-liequivalentes por gramo. Por ejemplo, la DEAE-celulo-sa puede tener una capacidad de 1,0 miliequivalentes/g (peso seco); DEAE-Sephadex,  $3,5 \pm 0,5$  miliequivalen-tes/g; y TEAE-Sephadex, 0,55 a 0,75 miliequivalentes/g,  
20 Se prefieren la DEAE-celulosa, la TEAE-celulosa y las resinas de dextrana reticuladas que contienen grupos dietilaminoetilo, en especial la primera. Es preferida la DEAE-celulosa fibrosa debido a su caudal, que es ma-yor que la de las formas micro-granulares. Sin embar-  
25 go, las últimas tienen un poder de resolución algo ma-



yer.

La orgoteína se aísla por elución selectiva de la resina de intercambio de ion. El procedimiento de esta invención implica adsorber la orgoteína junto con otras proteínas a partir de una mezcla en una columna que contiene la resina de intercambio de ion, eliminar por lavado de la columna cualquier cantidad que pueda estar presente de hemoglobina y otras proteínas no adsorbidas; eluir después de ello selectivamente la orgoteína de la columna y recuperar la orgoteína de la fracción del eluato que contiene orgoteína sustancialmente pura. Aunque estas etapas se llevan a cabo ordinariamente con la resina como lecho de una columna cromatográfica, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden emplear variaciones obvias equivalentes, p.ej., empastado de la resina con la solución de proteínas solubles de partida.

La cantidad de resina de intercambio de ion empleada, aunque no es crítica, afecta al rendimiento y a la pureza de la orgoteína aislada. Preferiblemente se emplean aproximadamente 0,25 a 0,5 ml de resina por mililitro de glóbulos rojos compactados o aproximadamente 100 miligramos de proteínas extraídas, sobre la base de una proporción aproximada de 15% de proteínas solubles en el tejido de partida. Una proporción



mayor (vol./peso) de resina a proteínas no presenta ventaja particular alguna.

Debido a que cualquier cantidad de hemoglobina y mioglobina en la solución de proteínas de partida no es adsorbida sobre la resina de intercambio de ion por debajo de su punto isoeléctrico, su separación junto con otras proteínas no adsorbidas se consigue fácilmente por lavado de la columna con un eluyente acuoso, preferiblemente uno que tenga un pH de aproximadamente 6. Para evitar la elución de la orgoteína, la concentración iónica de los medios acuosos debería ser menor que aproximadamente 0,01 M. En esta etapa se puede emplear agua o preferiblemente un tampón como se ha definido arriba, especialmente un tampón de fosfato. En muchos casos se requiere solamente varias veces el volumen vacío de la columna para liberar la columna de hemoglobina y otras proteínas no adsorbidas. La separación de hemoglobina se puede determinar fácilmente a partir del color del efluente.

Una vez que se ha eliminado de la columna cualquier cantidad existente de hemoglobina y de otras proteínas no adsorbidas, la etapa inmediatamente siguiente es la separación de la orgoteína de las restantes proteínas adsorbidas de una manera tal que produzca un eluato que contenga orgoteína sustancialmente



pura. Esto se puede lograr por elución selectiva de la orgoteína de la columna empleando un eluyente acuoso que tenga un pH de aproximadamente 6, esto es, de 5,7 a 6,3, y variando la concentración iónica de tal modo que se eluyan sucesivamente las proteínas adsorbidas. Un aspecto vital de esta invención, que emplea una etapa cromatográfica simple para aislar orgoteína sustancialmente pura, es la elución de las proteínas en una secuencia que proporciona una fracción de eluato que contiene orgoteína sustancialmente pura. Para conseguir esto, las proteínas adsorbidas se eluyen gradualmente de la columna y se controla el contenido en metales divalentes y, preferiblemente también, las absorbancias  $A_{265}$  y/o  $A_{280}$  del aluato.

Como se ha indicado arriba, es sumamente importante que el pH de los medios de elución sea aproximadamente 6 a las concentraciones iónicas utilizadas. A otros valores de pH se eluyen otras proteínas al mismo tiempo que la orgoteína, en cantidades tales que dan como resultado la producción de orgoteína muy impura, en lugar de orgoteína sustancialmente pura.

Un método conveniente para conseguir la elución sucesiva de las proteínas adsorbidas de la resina consiste en el empleo de un tampón de una concentración iónica que aumente gradualmente desde por debajo

de aproximadamente 0,01 M hasta por encima de 0,03 M. En el caso de la DEAE-celulosa, se eluye una porción sustancial de las proteínas no deseadas a una concentración iónica menor de 0,02 M. La orgoteína se eluye  
5 con un tampón de concentración aproximadamente 0,02 a 0,03 M, y las proteínas no deseadas restantes se eluyen a una concentración iónica mayor. Generalmente, se emplea una concentración iónica final de al menos aproximadamente 0,1 M y hasta aproximadamente 2 M, pa  
10 ra asegurar la limpieza de la columna, a fin de que pueda ser regenerada para su reutilización.

En lugar de un gradiente de concentración iónica gradualmente creciente, se puede emplear un gradiente escalonado, p.ej., de aproximadamente 0,001  
15 a 0,005 M para eluir las impurezas de proteínas que se eluyen fácilmente, aproximadamente 0,02 a 0,03 M para eluir la orgoteína, y aproximadamente 0,1 a 2,0 M para liberar la columna de impurezas de proteínas residuales.

20 Con indiferencia de si la resina se eluye con tampón de concentración iónica que aumente continuamente o que aumente de manera escalonada, con el fin de obtener orgoteína de alta pureza es importante que se tome un corte que se haya seleccionado  
25 del mejor modo que sea posible. Así, en cierto grado,



28 MAR 1975

el rendimiento global tendrá que estar equilibrado con  
tra la pureza final. No obstante, si el corte se toma  
exactamente en el punto óptimo, se obtiene un alto ren-  
dimiento de orgoteína sustancialmente pura. Un aspecto  
5 esencial de esta invención consiste en determinar con  
exactitud el punto en el que debe tomarse el corte de  
orgoteína.

La localización de la fracción del eluato que  
contiene orgoteína sustancialmente pura se puede deter-  
10 minar a partir de las medidas del contenido en metales  
divalentes, y preferiblemente también de al menos una  
de las absorbancias del eluyente a 280 nm y 265 nm,  
continuamente o a intervalos regulares frecuentes. Co-  
mo el eluyente no contendrá de ordinario, por otra par-  
15 te, cantidades importantes de iones metálicos divalen-  
tes, la elución de la orgoteína se puede detectar por  
un aumento acusado en el contenido de metales divalen-  
tes del eluato. Como la orgoteína se presenta usualmen-  
te en su estado natural en forma de un quelato mixto  
20 Cu-Zn, la medida del contenido de cobre o preferible-  
mente de ambos contenidos de cobre y zinc proporcio-  
na un método preciso para detectar orgoteína en el  
eluato.

Para obtener un corte que contenga orgoteína  
25 de la máxima pureza, se miden también las absorbancias



1975

del eluato  $A_{280}$  y  $A_{265}$ . Dentro de la fracción de eluato que tiene contenidos sustanciales de Cu y Zn, se toma el comienzo del corte de orgoteína cuando se emplean proteínas solubles procedentes de tejidos animales como material de partida, en el punto en que se registra un aumento en los contenidos de Cu y Zn acompañado por una disminución en las absorbancias a 265 y 280 nm. El final del corte se acusa por un descenso brusco en los contenidos de Cu y Zn y por un aumento brusco en las absorbancias a 265 y 280 nm. Solamente es necesario tomar uno de los contenidos de Cu y Zn y una de las absorbancias a 265 y 280 nm para determinar estos puntos. Sin embargo, preferiblemente se determinan la totalidad de los cuatro valores. Cuando se toman ambas absorbancias a 265 y 280 nm, se puede determinar también el comienzo del corte de orgoteína por la proporción  $A_{265}/A_{280}$ , es decir, que se toma el corte de orgoteína en el punto en que esta proporción alcanza un valor máximo, esto es, cuando está próxima a uno, o es mayor de uno. El final del corte de orgoteína se toma en el punto en que disminuye de nuevo la proporción  $A_{265}/A_{280}$ , lo que indica un aumento en el contenido de proteínas distintas de la orgoteína.

Para obtener un corte que contenga orgoteína de la máxima pureza, se miden también las absorbancias



A<sub>280</sub> y A<sub>265</sub> del eluato. Dentro de la fracción de eluato que tiene contenidos sustanciales de Cu y Zn, se toma el corte en el punto en que la proporción de A<sub>265</sub>/A<sub>280</sub> alcanza un valor máximo, es decir, está próxima a uno o es mayor de uno. El final del corte de orgoteína se toma en el punto en que los contenidos de Cu y Zn disminuyen y la proporción A<sub>265</sub>/A<sub>280</sub> disminuye también, lo cual es indicativo de un aumento en el contenido de proteínas diferentes de la orgoteína.

Un método cómodo para determinar instantáneamente el contenido de metales divalentes es por espectrofotometría de absorción atómica. Un aparato útil para la medida simultánea de cobre y zinc es el Modelo 353, de Instrument Laboratories, Inc., Lexington, Mass.

Las absorbancias A<sub>265</sub> y A<sub>280</sub> se pueden determinar de manera continua o intermitente de un modo convencional, o bien pueden registrarse directamente las proporciones por medio de un espectrofotómetro diferencial.

Representando las curvas de los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias A<sub>265</sub> y A<sub>280</sub> del eluato procedente de la cromatografía de intercambio de ion, p.ej., como se describe en el Ejemplo 2C, realizando medidas para cada parte alícuota de eluato, los conte-

nidos de Cu y Zn aumentan repentinamente cuando la molaridad del eluato alcanza aproximadamente 0,018 M. Después de alcanzar un máximo de aproximadamente 0,022 a 0,025 M, estos contenidos descienden repentinamente.

5 Las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  revelan un aumento brusco en el contenido de proteínas distintas de la orgoteína a 0,022 M, con un descenso en la proporción  $A_{265}/A_{280}$ . Esto va seguido por un aumento gradual de absorbancia hasta un máximo, aproximadamente a 0,04 M.

10 Las curvas de los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del eluato de la cromatografía de intercambio de ion se describen en el Ejemplo 1D, haciéndose determinaciones para cada parte alícuota de eluato. Como muestran las curvas, los  
 15 contenidos de Cu y Zn se elevan repentinamente cuando la molaridad del aluato alcanza aproximadamente 0,02 M. Después de llegar a un valor máximo aproximadamente a 0,02 M, estos contenidos disminuyen repentinamente. Las absorbancias  $A_{280}$  y  $A_{265}$  nm revelan un aumento  
 20 brusco a 0,025 M, con la relación  $A_{265}/A_{280}$  en el máximo o cerca del mismo. Esto va seguido por una disminución gradual en absorbancia y luego por un nuevo aumento a aproximadamente 0,034 M.

25 Se puede producir orgoteína pura por un tratamiento térmico de la orgoteína previamente purifica



20 MAR 1975

da con DEAE-celulosa como se describe en la Patente de los EE.UU. 3.579.494.

En otra variación, se puede utilizar una columna de tamaño grande de flujo rápido de 0,5 a 5 ml/ml de glóbulos rojos compactados como columna de separación de hemoglobina para las proteínas solubles de glóbulos rojos exentos de plasma, descompuestos y dializados, liberándose la columna de hemoglobina con un tampón de baja concentración iónica, p.ej., fosfato 0,005 M, después de la aplicación a la columna de cada partida de proteínas solubles de los glóbulos rojos. Este procedimiento se puede continuar hasta el momento en que aparecen en el eluato trazas de orgoteína (detectadas por la aparición de actividad como superóxido-dismutasa y/o por un aumento en los contenidos de Cu y Zn). La orgoteína se puede eluir o separar selectivamente de la columna exenta de hemoglobina y cargada con orgoteína con un tampón de concentración intermedia, p.ej., de concentración iónica 0,02 a 0,04 M. Si se separa la orgoteína de la columna por arrastre, la orgoteína separada se puede liberar después de anhidrasa carbónica y otras impurezas por una etapa de calentamiento como se describe en esta memoria. Después de separar las proteínas precipitadas y dializar a una concentración iónica inferior a 0,01

M, la orgoteína puede, si se desea, purificarse ulteriormente en una segunda columna de intercambio de ion con DEAE-celulosa más pequeña, p.ej., de 0,05 a 0,5 ml/mg de orgoteína, revelada como se describe en el

5 Ejemplo 1D.

En una variación adicional, los glóbulos rojos de la sangre, descompuestos y dializados, se suspenden en aproximadamente 0,25 a 1 vol/vol de la resina de intercambio de ion de DEAE-celulosa, y la suspensión se filtra o centrifuga después y se lava hasta que esté exenta de hemoglobina. La resina exenta de hemoglobina se suspende o se lava luego con una cantidad mínima de tampón de concentración iónica moderada, p.ej., fosfato 0,005 M llevado a concentración

10 iónica 0,04 M con NaCl, para redissolver la orgoteína en el tampón. La resina puede liberarse de proteínas adsorbidas residuales con un tampón de concentración iónica mayor, p.ej., 0,1 M, y luego se regenera y se equilibra de la manera descrita en esta memoria. La orgoteína y otras proteínas disueltas pueden adsorberse

15 después y eluirse selectivamente en una columna con una cantidad más pequeña de DEAE-celulosa, p.ej., de 0,1 a 0,25 ml/ml, como se ha descrito arriba, y/o someterse a una etapa de tratamiento por el calor o de

20 tratamiento con enzimas proteolíticas.

25



1975

En otras variaciones del procedimiento cromatográfico arriba descrito para el aislamiento de la orgoteína a partir de tejidos animales, la columna que se ha liberado de todas las proteínas que se pueden retirar de la misma con un eluyente de concentración iónica inferior a aproximadamente 0,01 M, se libera de la mayor parte o la totalidad de las proteínas residuales distintas de la orgoteína adsorbidas en la misma calentando la columna a 65-70°C durante aproximadamente 5 a 20 minutos, p.ej., haciendo pasar a su través tampón de fosfato 0,005 M caliente.

La orgoteína se puede aislar del eluato de una manera convencional, p.ej., por liofilización, preferiblemente después de diálisis contra agua desionizada para eliminar los iones del tampón.

La orgoteína aislada por el procedimiento de esta invención es de alta calidad y puede ser inyectada sin reacciones secundarias inmunológicas. Como se describe en la patente de los EE.UU. 3.579.495, en la patente de Bélgica 687.828 y en la patente Británica 1.160.151, la orgoteína es útil, entre otras cosas, como agente anti-inflamatorio. La orgoteína así aislada puede, sin embargo, contener cantidades traza de proteínas extrañas que, aun cuando no producen una reacción inmunológica inmediata, tienen capacidad potencial



para hacerlo así después de la administración parente-  
ral prolongada. Estas proteínas traza se pueden elimi-  
nar de diversas maneras. Una de tales maneras es por  
filtración en estado de gel utilizando una resina mi-  
croporosa, p.ej., Sephadex G-75 (resina de dextrana re-  
ticulada con epíclorhidrina, Farmacia, Suecia). La re-  
sina Sephadex se ha hinchado, refinado y lavado por  
técnicas normalizadas descritas en la bibliografía del  
fabricante. Las columnas rellenas se equilibran con  
tampón de 0,05 tris-HCl de pH 7,5, KCl 0,15M, 0,005  
glicina,  $\text{Cu}^{++} 10^{-4} \text{ M}$ , y  $10^{-5} \text{ Zn}^{++}$ , y se ajustan a un  
caudal de aproximadamente 2,0 ml/cm<sup>2</sup> por hora. La adi-  
ción de 5 a 10% de dextrosa o sacarosa a la solución  
mejora la uniformidad de aplicación, lo cual hace que  
mejore la resolución subsiguiente. Después de aplica-  
ción a la columna, se revela ésta con solución tampón  
adicional. Se recogen las fracciones individuales. La  
aparición de máximos se determina midiendo la absor-  
bancia en cualquier punto comprendido entre 200 y 280  
nm.

Se puede producir también ergoteína ultra-pu-  
ra a partir de la ergoteína aislada con DEAE-celulosa  
por un post-tratamiento por el calor de la porción del  
eluato que contiene la ergoteína y  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$ , p.ej.,  
a 65-75°C durante 15 minutos a un pH de 5,8 seguido

16.12.72



por centrifugación y diálisis; por una segunda purificación cromatográfica de intercambio de ion con DEAE-celulosa; o por tratamiento con un enzima proteolítico, todo ello como se ha descrito arriba.

5 Los ejemplos que siguen son ilustrativos de esta invención, la cual no está limitada a ellos.

#### TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

##### EJEMPLO 1A

10 Se mezcló 1 kg de hígado de buey con 2 litros de tampón Tris, de pH 7,5, en sacarosa 0,3 M y KCl 0,05 M. La suspensión se centrifugó a 13.000 x G durante 1 a 2 horas. El líquido turbio sobrenadante tenía un volumen de 2150 ml y un pH de 6,3.

15 Porciones de 100 ml del líquido sobrenadante (60 mg de proteínas/ml, 0,15 mg 0,3 mg de orgoteína/ml) se pusieron en digestión a la temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas con las enzimas proteolíticas que se muestran en la Tabla siguiente.

20 La cantidad seleccionada de cada enzima se basaba en sus costes relativos (1,34 Pts/ml, excepto la pancreatina a 0,67 Pts/ml), más bien que en su eficiencia esperada, dado que un objetivo fundamental era desarrollar un procedimiento industrial con la máxima ventaja económica.

25



TABLA I

Núm.	Enzima	Cantidad de enzima (por 100 ml de extracto de hígado)	pH; tampón	Purificación *
a.	Proteniasa de Strep. griseus (Pronasa)	200 mg	8,0 con Tris 1 M + 1 ml de $Ca^{++}$ (vol. final 114 ml)	100 veces
b.	Pancreatina	15 g	7,5 con Tris 1 M (vol. final 150 ml)	20 veces
c.	Subtilisina	40 mg	7,5 con Tris 1 M (vol. final 105 ml)	10 veces
d.	Peptidasa de cerdo	166 mg	7,0 con Tris 1 M (vol. final 112 ml)	1,5 veces
e.	Papaína (obtenida a partir de carica papaya)	16 mg	8,3 (vol. final 100 ml)	7 veces
f.	Bromelína (ananasa)	9 g	5,2 con acetato sódico 1 M, pH 5,0 (136 ml)	7 veces

\* La purificación completa corresponde a aproximadamente 300 veces.

El análisis del electroforograma (después de  
20 diálisis para separar las proteínas degradadas, y fil-  
tración) del líquido sobrenadante convertido con en-  
zima mostró que, con las cantidades empleadas, Prona-  
sa y pancreatina eliminaban la mayor proporción de im-  
25 purezas proteínicas, siendo la subtilisina la enzima  
más eficiente después de aquéllas, seguida por papaína



1975

y bromelina. Los resultados más deficientes se obtuvieron con la peptidasa de cerdo. Las impurezas de proteínas remanentes después de la digestión con pan creatina y bromelina se separan con gran facilidad por cromatografía de intercambio de ion con DEAE-celulosa.

#### EJEMPLO 2A

Se mezclaron 408 g de hígado fresco con 816 ml de Tris 0,025 M, pH 7,5, en sacarosa 0,3 M y KCl 0,05 M. La suspensión se centrifugó a 13000 x G durante 1 hora. El líquido turbio sobrenadante tenía un volumen de 800 ml y un pH de 6,3.

Porciones de 100 ml del líquido sobrenadante, que contenían de 15 a 30 mg de orgoteínas, se sometieron durante 2 días a 37°C a digestión con una cantidad de una enzima proteolítica en las condiciones que se muestran en la Tabla siguiente (con adición de 0,1% de azida de sodio como agente de conservación), seguida por diálisis.

25

16.12.72

**POOR  
QUALITY**



TABLA II

Núm.	Enzima	Cantidad de enzima (100 ml de extracto)	pH; tampón	Purificación resultante después de la digestión
a.	Pronasa	40 mg	pH 8,0 con Tris 1 M + 1 ml de $Ca^{++}$ 0,1 M	20 veces
b.	Pancreatina	6 g	pH 7,5 con Tris 1 M	20 veces
c.	Subtilisina	8 mg	pH 7,5 con Tris 1 M	10 veces
d.	Papaína	3,2 mg	pH 6,2	5 veces

10 Se obtuvieron los mejores resultados con pancreatina, Pronasa y subtilisina. También en este caso, la proteína residual se separó con la máxima facilidad después de la digestión con pancreatina por cromatografía de intercambio de ion con DEAE-celulosa.

15

EJEMPLO 3A

Se mezclaron 300 g de hígado con 600 ml de Tris 0,025 M; glicina 0,025 M en  $Mn^{++}$  0,01 M, pH 7,5. Se centrifugó la suspensión. El residuo se compactaba mucho mejor en este tampón. El líquido sobrenadante (110 mg de proteínas/ml) tenía un volumen de 570 ml. Se sometieron porciones del mismo a digestión enzimática con pancreatina o Pronasa de las concentraciones que se muestran abajo, y se efectuó luego diálisis para separar la orgoteína de las proteínas degradadas.

16.12.72



TABLA III

Núm.	Enzima	Condiciones	Cantidad de enzima (100 ml de extracto)	Purificación
a.	Pronasa	38°C, pH 8,0 con Tris 1 M; 0,1% de azida de Na; Ca <sup>++</sup> 0,001 M	2 mg	3 veces
b.	Pronasa	38°C, pH 8,0 con Tris 1 M; 0,1% de azida de Na, Ca <sup>++</sup> 0,001 M	4 mg	5 veces
c.	Pancreatina	38°C, pH 7,5 con Tris 1 M; 0,1% de azida de Na	300 mg	20 veces
d.	Pancreatina	38°C, pH 7,5 con Tris 1 M; 0,1% de azida de Na	600 mg	20 veces

15 La pancreatina exhibió prácticamente igual efectividad a todas las concentraciones ensayadas (de 3 a 150 mg/ml). La pronasa fue menos efectiva cuando se diluyó desde 2 mg/ml a 0,02 ó 0,04 mg/ml.

EJEMPLO 4A

20 Se mezcló hígado de buey con Tris 0,025 M, glicina 0,025 M en Mn<sup>++</sup> 0,01 M, a pH 7,5 en una proporción de 2 ml de tampón por g de hígado. La pasta se centrifugó a 0°C y a 20.000 x G durante 60 minutos (proteínas extraídas, 60 g/litro de líquido sobrenadante; orgoteína, aproximadamente 150 mg/litro). Se preparó una solución madre de pancreatina (100 mg/ml)

25



1975

(Calidad VI, de páncreas de cerdo; actividad equivalente a 4 x NF) en tampón Tris-HCl 0,05 M de pH 7,5. El líquido sobrenadante del extracto de hígado de buey, con un pH de 6,7, se valoró a pH 7,5 con Tris 1 M.

5 A cada 100 ml de extracto de hígado de buey se añadieron 6 ml (0,6 g) de solución madre de pancreatina y 1 ml de azida de sodio al 10%. La mezcla (pH 7,5) se incubó a 37°C durante 2 días, en cuyo transcurso el color de la mezcla cambió de rojo a pardo. (proteína residual, aproximadamente 3 g/l; orgoteína, aproximadamente 150 mg/l).

10 La mezcla de incubación se dializó después contra agua desionizada durante una noche y finalmente en tampón de fosfato 0,005 M de pH 6,0 (tampón col.). El producto dializado se centrifugó a 0°C, en condiciones de 20000 x g durante 1 hora, y luego se filtró a través de un microfiltro Versapore. El filtrado tenía un pH de 6,3 y una conductividad de aproximadamente 250  $\mu$ mho.

20 El contenido de orgoteína de las proteínas remanentes en aquél era mayor del 5%, en comparación con aproximadamente 0,2% en las proteínas solubles extraídas de la suspensión de partida. Se aisló orgoteína pura a partir del filtrado de la manera que se describe a continuación.

25

16.12.72



Se rellenó una columna de intercambio de ion de pequeñas dimensiones con dietilaminoetil-celulosa DEAE 52, de 8,5 ml de volumen de lecho. Se equilibró con tampón de fosfato 0,005 M, de pH 6,0. El caudal fue aproximadamente de 20 ml por hora. Se cargaron en la columna 253 ml del filtrado arriba descrito, equivalente a 82 g de hígado (9,6 g de hígado/ml). Se lavó después la columna con 30 ml de tampón de fosfato 0,005 M, de pH 6,0. Se eluyó la orgoteína con un gradiente lineal de fosfato 0,005 M, de pH 6,0, a fosfato 0,005 M en NaCl 0,075 M, de pH 6,0, en un volumen total de 170 ml. La posición del pico de la orgoteína se localizó con mancha de enzima NBT, y las impurezas por electroforegramas de mancha de proteína azul Coomassie sobre agarosa. Los tubos que contenían orgoteína y una proporción esencialmente nula de impurezas se reunieron en una sola fracción, y aquéllos que contenían orgoteína junto con cierta proporción de impurezas en otra fracción. Ambas fracciones se dializaron por separado, se añadió, en caso deseado, sacarosa como estabilizante, se filtraron y se liofilizaron.

El rendimiento de orgoteína pura fue de 27,6 mg (0,034%, basado en el hígado de partida; 62% del teórico). El rendimiento de orgoteína sustancialmente pura fue de 10,0 mg (0,012%; 22% del teórico), lo que



daba una recuperación total de orgoteína de 84% del valor teórico.

La orgoteína sustancialmente pura se puede recircular o purificar adicionalmente por un tratamiento enzimático con otra enzima proteolítica, p.ej.,  
5      Pronasa, o por cromatografía en estado de gel o cromatografía de intercambio de ion.

#### EJEMPLO 5A

10            Se sigue el procedimiento del Ejemplo 1A ó 2A empleando una cantidad de pronasa copulada a hidrazida de acetyl-celulosa o carboximetil celulosa (Enzita), enzimáticamente equivalente a la pronasa empleada en aquél ejemplo. Después de digestión, se separa  
15      la pronasa por filtración y se aísla la orgoteína del filtrado de la manera arriba descrita.

#### EJEMPLO 6A

20            Se sigue el procedimiento del Ejemplo 5A, empleando una solución al 1% de orgoteína (70-97% de pureza) que contiene proteínas extrañas residuales, en Tris 0,025 M, glicina 0,025 M y  $\text{CaCl}_2$  0,001 M. Después de 2 días a 37°C, la solución de orgoteína está completamente exenta de proteínas extrañas. Se aísla  
25      la orgoteína pura por filtración, diálisis y liofilización.



zación.

EJEMPLO 7A

5 Se separan las proteínas solubles de las ma-  
terias insolubles contenidas en hígado de buey de la  
manera que se ha descrito en el Ejemplo 4A, ó después  
de rotura de las células por sonificación, o por fil-  
tración a alta presión. Después de centrifugar, se  
ajusta el pH del líquido sobrenadante a 6,0 y se ca-  
10 lienta con rapidez a 65-80°C, manteniendo dicha tempe-  
ratura durante 15 a 90 minutos. Se enfría a 37°C y se  
separa el precipitado abundante formado por centrfu-  
gación o filtración. (Proteínas residuales, menos  
del 10% de las proteínas extraídas; orgoteína, apro-  
15 ximadamente 200 mg/l.)

Se ajusta el pH del extracto tratado térmica  
mente a 7,5 con tampón de Tris 1 M y se añaden a  
aquél, a 37°C, aproximadamente 3 g de pancreatina o  
aproximadamente 50 mg de pronasa por litro de extrac-  
20 to. Al cabo de dos días, se enfría a la temperatura am-  
biente y se dializa como se ha descrito en el Ejemplo  
4A. El producto dializado contiene orgoteína que se  
puede aislar del mismo, si se desea, por cromatografía  
en una columna de intercambio de ion cargada con DEAE-  
25 celulosa, p.ej., como se ha descrito en el Ejemplo

4A.

EJEMPLO 8A

5 Se sigue el procedimiento del Ejemplo 7A,  
excepto que se calienta la mezcla total de hígado  
de buey homogeneizado y extracto acuoso antes de la  
centrifugación en lugar de hacerlo después, eliminán-  
dose con ello una de las etapas de separación. Esta  
10 variación reduce en más de 80% las proteínas extrañas  
extraídas juntamente con la orgoteína del hígado.

EJEMPLO 9A

15 Se sigue el procedimiento del Ejemplo 7A ó  
8A, excepto que se emplea primeramente pancreatina y  
luego, dos días más tarde, pronasa adsorbida sobre  
un soporte insoluble en la etapa de tratamiento con  
enzima, cada una de ellas en las cantidades indicadas  
en el Ejemplo VII.

EJEMPLO 10A

20 Se sigue el procedimiento del Ejemplo 8A,  
excepto que se reduce el volumen de tampón empleado  
en la extracción en un 25 a 75%.

EJEMPLO 11A

25



Se sigue el procedimiento del Ejemplo 8A, empleando un peso igual de eritrocitos lavados y compactados de bovino, equino o de seres humanos en lugar de hígado como material de partida.

5

#### EJEMPLO 12A

Se siguen los procedimientos de los Ejemplos 1A-4A ó 7A-9A, excepto que, después de la digestión con pancreatina, se precipita fraccionadamente con 10 0,5 y 1,5 vol/vol de acetona para reducir más las impurezas proteínicas extrañas y para concentrar adicionalmente la orgoteína. Se puede llevar a cabo una purificación subsiguiente por cromatografía, p.ej., con DEAE-celulosa, del precipitado, con una carga de muestra de al menos 30 g equivalentes de hígado por ml de adsorbente. 15

#### EJEMPLO 13A

Para determinar el efecto de llevar a cabo 20 la etapa de digestión proteolítica en diversas fases del aislamiento de la orgoteína, se sometieron hígado integral de buey, proteínas solubles del hígado de buey y proteínas solubles de hígado de buey tratadas térmicamente a una purificación enzimática con pancreati 25 na.



MAYO 1975

Para obtener un extracto de las proteínas solubles de hígado de buey, se mezclaren 500 g (150 g de sólidos) de hígado de buey en un mezclador con un litro de una solución tampón de Tris 0,25 M, glicina 5 0,025 M y Mn <sup>++</sup> 0,01 M, de pH 7,5, para dar 1380 g/ml de suspensión. Se sometieron porciones de 100 ml de la suspensión resultante a uno de los tratamientos siguientes:

10 A. Se centrifugó la suspensión, en condiciones de 13.000 x g durante 1 hora, para dar 78 ml (aproximadamente 6 g de sólidos, alrededor de los 2/3 del total) de líquido sobrenadante, que contenía 100% de las proteínas solubles y 100% de la ergoteína contenida en el hígado de partida.

15 B. Los 78 ml del líquido sobrenadante de la etapa A se sometieron a degradación proteolítica con 300 mg de pancreatina; pH 7,5; 37°C, 24 a 48 horas. Después de dicho tratamiento, quedaba el 100% de la ergoteína y menos del 10% de las proteínas solubles 20 totales del hígado de partida.

C. Se sometieron 100 ml de la suspensión de hígado de partida a un tratamiento térmico a 65°C durante 15 minutos; se enfrió y se centrifugó para dar 78 ml de líquido sobrenadante y 7,6 g (89,5%) de 25 proteínas insolubles precipitadas. Los 78 ml de líqui

28 MAY 1975

5 de sobrenadante se sometieron después al tratamiento enzimático de la etapa B. Después de dicho tratamiento, quedaba el 100% de la orgeteína y menos del 6% de las proteínas solubles totales del hígado de partida.

10 D. Los 78 ml de líquido sobrenadante procedentes de la etapa de centrifugación de la etapa A se sometieron a la etapa de tratamiento térmico de la etapa C. La centrifugación produjo 60 ml (2,70 g de sólidos) de líquido sobrenadante y 2,05 g de precipitado. Los 60 ml de líquido sobrenadante se sometieron luego al tratamiento con enzima proteolítica de la etapa B. Después de dicho tratamiento quedaba del 3 al 6% de las proteínas solubles.

15 De los resultados obtenidos en el Ejemplo 13A se deduce claramente que una etapa de tratamiento térmico antes del tratamiento enzimático hace que éste último sea más eficiente, debido a que en las etapas C y D solamente quedaba de 3 a 6% de las proteínas solubles totales, mientras que en B quedaba más del 6%.

TRATAMIENTO TERMICO

EJEMPLO 1B

25 Se descompusieron eritrocitos de bovino en



dos veces su volumen de agua que contenía  $1/\mu\text{g}$  de  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$  por cada  $5/\mu\text{g}$  de ergoteína estimada en los glóbulos rojos de la sangre, y se calentaron a  $70-75^{\circ}\text{C}$  durante 1 a 2 horas a un pH de aproximadamente 7, es decir, al pH del punto isoeléctrico de la hemoglobina. Se diluyó de 2 a 3 veces, se enfrió y se centrifugó la pasta resultante a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se dializó y se liofilizó el líquido sobrenadante, que contenía ergoteína sustancialmente purificada,

5

#### EJEMPLO 2B

Se lavaron en suspensión y se congelaron para dejarlos exentos de suero glóbulos rojos compactados de equino, en dos veces su volumen de agua. Se ajustó el pH a 5,5 con ácido acético. Se calentó la suspensión durante 15 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Se enfrió a aproximadamente la temperatura ambiente o a temperatura más baja, y se separaron por centrifugación las proteínas precipitadas. Se ajustó el pH a 7,5 para precipitar el color rojo, y se centrifugó. Se mezcló el líquido sobrenadante con las tres cuartas partes de su volumen de acetona enfriada con hielo. Se centrifugó y se desecó el precipitado.

15

20

25

De la ergoteína bruta así producida se podía aislar ergoteína sustancialmente pura por filtra-



ción en estado de gel con tamiz molecular utilizando  
dextrana reticulada (Sephadex G-75) como se describe  
en la Patente de los EE.UU. Núm. 3.579.495 ó por cro-  
matografía con resinas de intercambio de ion utilizan  
5 do DEAE-celulosa como se describe en la Preparación  
Núm. 3 de la Patente de los EE.UU. Núm. 3.637.640.

#### EJEMPLO 3B

Se siguió el procedimiento de los Ejemplos  
10 1B ó 2B empleando glóbulos rojos de la sangre de bovi-  
nos, seres humanos, pollos, ovejas o cerdos, y se ca-  
lentó aproximadamente a sus respectivos puntos isoelec-  
tricos de hemoglobina, p.ej., a pH 6,8-7,4, preferible-  
mente a aproximadamente 7,0.

15

#### EJEMPLO 4B

Se siguió el procedimiento de los Ejemplos  
1B, 2B ó 3B, excepto que se calentaron los glóbulos  
rojos en ausencia de agua adicional o en presencia de  
20 un volumen igual de agua.

20

#### EJEMPLO 5B

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2B,  
excepto que se añadieron 1,5 volúmenes de acetona en  
25 una sola vez. Se obtuvo orgoteína de menor pureza. La



trituration del precipitado con un volumen mínimo de  
agua extrajo selectivamente la orgoteína del precipi-  
tado. La centrifugación dió una solución de orgoteína  
de aproximadamente la misma pureza que la obtenida en  
5 el Ejemplo 2B.

#### EJEMPLO 6B

Se siguió el procedimiento de los Ejemplos  
2B ó 3B, excepto que se omitió la primera centrifuga-  
10 ción.

#### EJEMPLO 7B

Se siguió el procedimiento de los Ejemplos  
2B, 3B, 4B, ó 6B, excepto que no se separó ninguno de  
15 los precipitados hasta después de la adición de los  
primeros 0,75 volúmenes de acetona.

#### EJEMPLO 8B

Se siguió el procedimiento de cualquiera de  
20 los Ejemplos 1B a 7B, excepto que se calentó a 80°C  
durante aproximadamente 30 minutos en la etapa de ca-  
lentamiento.

#### EJEMPLO 9B

25 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2B,



28 MAY 1975

pero empleando ultrafiltración en lugar de la precipi-  
tación con acetona con objeto de reducir el volumen  
que hubiera de someterse a la cromatografía.

EJEMPLO 10B

5

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2B,  
pero empleando la liofilización en lugar de la preci-  
pitación con acetona.

EJEMPLO 11B

10

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1B,  
excepto que se calentaron glóbulos rojos de bovino o  
de seres humanos, diluidos con agua en relación 1:2,  
a pH 7,0, durante 18 horas a 65°C.

15

EJEMPLO 12B

20

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2B  
utilizando glóbulos rojos de bovinos, equinos, seres  
humanos, pollos, ovejas o cerdos, pero utilizando una  
digestión enzimática de las impurezas proteínicas en  
lugar de la precipitación con acetona, p.ej., por adi-  
ción al líquido sobrenadante resultante de la etapa de  
calentamiento de 1 a 3 mg de pancreatina por ml de  
glóbulos rojos compactados de partida e incubación a  
aproximadamente 37°C durante 15 a 48 horas. Esencial-

25



mente la totalidad de las proteínas excepto la orgoteína se convirtieron en fragmentos digeridos pequeños y dializables. De la mezcla digerida se podía aislar orgoteína esencialmente pura por ultrafiltración.

5

#### EJEMPLO 13B

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1B, pero empleando como material de partida sangre integral estabilizada contra la coagulación con citrato sódico.

10

Se mezclaron dos volúmenes de sangre de bovino recientemente recogida (85 mg/ml de proteínas totales, 20  $\mu$ g/ml de orgoteína) con 1 volumen de solución acuosa patrón de citrato trisódico al 3,8%, y dos volúmenes de agua que contenía 25  $\mu$ g/ml de  $\text{Cu}^{++}$  M y 25  $\mu$ g/ml de  $\text{Zn}^{++}$  M, obteniéndose así una solución de sangre integral que contenía 1000  $\mu$ g de iones  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$  por cada 100 ml. Se calentó a 75°C y se mantuvo a dicha temperatura durante 2 horas. Se enfrió a aproximadamente 10°C por adición de 150 ml agua de hielo. Esta dilución elimina también la necesidad de una etapa de lavado separada después de la centrifugación. Se centrifugó y se separó el líquido sobrenadante (234 ml). El líquido sobrenadante contenía un total de 1,6 mg de

15

20

25



5       senta al menos una purificación de 40 veces y un 70%  
de recuperación de la ergoteína contenida en la sangre  
de partida. Esto se compara con un 90% de recuperación  
de ergoteína y al menos una purificación de 50 veces  
cuando se parte de glóbulos rojos sin lavar (90 mg/ml  
de proteínas totales) en lugar de sangre integral.

10       Se aisló ergoteína sustancialmente pura del  
líquido sobrenadante por liofilización, como se descri-  
be en el Ejemplo 1B, ó filtración a través de tamiz mo-  
lecular, o cromatografía con DEAE-celulosa como se ha  
descrito en el Ejemplo 2B.

15       Para purificar adicionalmente la ergoteína  
antes de su aislamiento como se ha descrito arriba, se  
mezclaron 59 ml del líquido sobrenadante de la etapa  
de purificación térmica que contenía de 12 a 17 µg/ml  
de ergoteína con 50 a 150 mg de pancreatina y 0,1% de  
azida de sodio (para impedir el desarrollo de las bac-  
terias), y se mantuvo a 37°C durante 15 horas, enfrián-  
dese después. La solución contenía 1 mg/ml de proteínas  
20       totales y 12 µg/ml de ergoteína.

25       En la realización de los procedimientos arri-  
ba indicados, la sencillez y la comodidad están com-  
pensadas en cierto grado frente a la pureza deseada pa-  
ra la ergoteína aislada del líquido sobrenadante obte-  
nido después de la separación de las proteínas precipi



tadas de los glóbulos rojos calentados. Así, la precipitación con acetona produce una ergoteína más pura pero tiene la desventaja de requerir el empleo de disolvente orgánico. La cromatografía en columna por intercambio de ion con DEAE-celulosa produce ergoteína de pureza satisfactoria, pero presenta la desventaja de requerir una etapa de diálisis para llevar la concentración iónica a niveles adecuadamente bajos, y la cromatografía de grandes volúmenes de líquido. La última desventaja, sin embargo, se puede eliminar por concentración previa del líquido sobrenadante mediante liofilización o evaporación a temperatura baja de sólo una porción del líquido sobrenadante. La adsorción por cargas, suspendiendo el líquido sobrenadante con una resina de intercambio de ion, es más cómoda que la cromatografía en columna, pero es menos eficiente. La liofilización, a no ser que vaya precedida por diálisis, no produce purificación alguna por sí misma, pero es un método muy cómodo para aislar la ergoteína a partir del gran volumen de líquido sobrenadante.

#### Ergoteína Purificada

La ergoteína bruta obtenida de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de los ejemplos ante-



rieres se puede aislar en forma pura por cromatografía en estado de gel con tamices moleculares de hasta 2 a 5 g de la ergoteína bruta en una columna (de 3,2 cm x 88,5 cm; volumen total de leche, 711,5 ml, volumen vacío, 265,5 ml) de resina de dextrana reticulada con epíclorhidrina Sephadex G-75 Superfina (Farmacia, Suecia), recogida del eluate en fracciones de 5,4 ml y medición de las absorciones  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del mismo. Comenzando aproximadamente con la fracción núm. 50, estas absorciones aumentan bruscamente y alcanzan un máximo aproximadamente en la fracción 68. Las fracciones 66 a 73 contienen la mayor parte de la ergoteína total en estado ultrapuro. Hacia la fracción 98, estas absorciones descienden a cero, hasta llegar aproximadamente a la fracción 116. Las únicas impurezas importantes aparecen en los tubos 45 a 60 y en los tubos 118 a 150.

Alternativamente, se aplica una solución acuosa de hasta aproximadamente 10 g de la ergoteína bruta obtenida en el Ejemplo 1B a una columna (de 2,5 x 30 cm; volumen de leche, 147 ml) de DEAE-celulosa (DEAE-23 Fibrosa, Reeve-Angel) equilibrada con tampón de fosfato 0,005 M, de pH 6,0. Se revela la columna a un caudal de 240 ml/hr con tampón de fosfato 0,005 M. La elución de la ergoteína se efectúa con 4 litros

del mismo tampón que tiene una concentración de NaCl creciente desde 0 a 0,08 M. Se determinan los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del eluato, p.ej., como se ha descrito en los ejemplos dados en esta memoria. Aparecen tres picos principales, todos ellos con estructura fina, que comienzan a 575 ml, 750 ml y 1.425 ml del eluato que aumenta escalonadamente. La orgoteína (segundo pico) está presente en la porción del eluato en la que la relación de absorbancia  $A_{265}/A_{280}$  es 1,27 y los contenidos de Cu y Zn son máximos. La porción de 750 ml a 1030 ml (0,025 a 0,035 M) del eluato que aumenta escalonadamente contiene sustancialmente la totalidad de la orgoteína en un estado de gran pureza.

15

PURIFICACION CROMATOGRAFICA EN UNA SOLA ETAPA

EJEMPLO 1C - Cromatografía de Orgoteína Procedente de Hígado de Buey.

Se corta hígado de buey (212 g) en tiras de 2 cm de ancho, se eliminan el tejido conjuntivo y los vasos sanguíneos, se lava para eliminar la sangre y se homogeniza a la máxima velocidad en un mezclador de alta velocidad (esterizer) con 3,8 ml/g de hígado de tampón 0,025 M de tris-HCl, de pH 7,5, en sacarosa 0,3 M y HCl 0,05 M. Se centrifuga (20.000 G; 0°C; 60 min); se separa el producto centrifugado; se dializa el lí-

25



quido sobrenadante en fosfato 0,005 M, a pH 6,0; se centrifuga de nuevo y se filtra a través de un filtro de tipo microporo (Versapore) para obtener una solución clara.

5                    Se aplica el filtrado directamente a una columna de intercambio de ion cargada con dietilaminoetilcelulosa (aproximadamente 40 g; de 2,5 cm x 40 cm) (DE-23, fibrosa, W. & R. Balston, Ltd., Hardstone, Kent, Inglaterra). Se lava la columna (caudal: 200 ml/hr) con  
10 un litro de tampón de fosfato (0,005 M, a pH 6,0) y después con cuatro litros del mismo tampón que contiene NaCl en una cantidad continuamente creciente con un gradiente poco acusado desde 0 a  $7,5 \times 10^{-2}$  M; caudal: 200 ml/hr. Se determinan las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$   
15 del eluato y se comprueban continuamente los contenidos de Cu y Zn del mismo por espectrofotometría de absorción atómica. (Instrumentation Laboratories, Inc., Lexington, Mass., Modelo 353). Después de recoger un litro de eluato que no contiene nada de NaCl y 750 ml de  
20 eluato que contiene cantidades gradualmente crecientes de NaCl ó KCl, en cuyo punto la molaridad alcanza gradualmente aproximadamente 0,018 M, los valores de absorción  $A_{265}$  y  $A_{280}$  nm descienden a valores bajos y los contenidos de Cu y Zn aumentan bruscamente. El  
25 eluato que se recoge después de ello, hasta el punto



en que el contenido de Cu desciende de nueve a un mí-  
nimo y la molaridad llega a ser aproximadamente  $2,8 \times$   
 $10^{-2}$  M (550 ml de eluato) contiene 240 mg de ergoteína  
de pureza satisfactoria. Cuanto más estrecho es el cor-  
te tomado de esta porción del eluato, tanto mayor se-  
rá la pureza de la ergoteína aislada del mismo, y me-  
nor el rendimiento en aquélla.

La ergoteína de la máxima pureza está presen-  
te en el eluato que tiene una concentración iónica de  
aproximadamente 0,022 M (a 950 ml de eluato total). En  
este punto, ambas curvas de absorción de Cu y Zn exhi-  
ben máximos. La diálisis de la fracción de 750 ml a  
1300 ml del eluato contra agua a una conductividad de  
0,04  $\mu$ mho, la filtración a través de un filtro de tipo  
microperero (Millipore, de 0,22  $\mu$ ) y la liofilización en  
condiciones estériles, preferiblemente después de mez-  
clar con aproximadamente dos veces su peso de sacarosa,  
calculado sobre la ergoteína, produce ergoteína inyec-  
table aislada, plenamente activa, no antígena, de una  
calidad comparable a la que se prepara en la actualidad  
comercialmente para uso veterinario.

Si se desea, el lavado de la columna para se-  
parar proteínas no adsorbidas y ligeramente adsorbidas  
antes de eluir la ergoteína se puede llevar a cabo tam-  
bién a una concentración iónica constante o bien a una



28 MAYO 1975

concentración iónica que aumente escalonadamente o de manera continua, p.ej., eluyendo la columna con la solución también arriba descrita que tiene una concentración iónica de aproximadamente 0,012 M a aproximadamente 0,015 M, hasta que las absorciones  $A_{265}$  y  $A_{280}$  descienden a valores mínimos, y eluyendo luego la ergoteína a una concentración iónica constante (p.ej., aproximadamente 0,02 M) o a una concentración iónica que aumente escalonadamente o de manera continua dentro del margen de aproximadamente 0,018 M a aproximadamente 0,028 M. La columna se puede liberar luego de proteínas adsorbidas residuales aumentando la concentración iónica del eluyente a aproximadamente 0,1 M ó mayor.

15 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1C, se obtienen resultados comparables utilizando TEAE-celulosa y una resina de dextrana reticulada que contiene grupos dietilaminoetilo (DEAE-Sephadex).

20 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1C, se obtienen resultados comparables partiendo, respectivamente, de las proteínas solubles extraídas del cerebro, riñones, bazo, pulmones, testículos, páncreas, timo, vísceras y tejido muscular de bovinos, así como de los mismos tejidos precedentes de cerdos,  
25 caballos, ovejas y pollos.



EJEMPLO 2C - Cromatografía de Orgoteína Procedente de  
Hígado de Buey

Se sigue el procedimiento del Ejemplo 1C, utilizando DEAE-celulosa Microgranular, DE-52, como resina de intercambio de ion. Esta resina tiene la ventaja de dar una separación más neta entre la orgoteína y las otras proteínas, pero presenta la desventaja de un caudal más bajo. El espectro de elución se muestra en la figura 2C.

El gradiente de elución para el corte de orgoteína está comprendido entre 0,020 y 0,025 M (tubos 85 a 110, de 10 ml cada uno), obteniéndose 165 mg de orgoteína de pureza satisfactoria. Preferiblemente, el corte se toma desde 0,020 a 0,023 M (tubos 85 a 100), dado que el corte más estrecho da orgoteína de mayor pureza, prácticamente sin pérdida alguna de la orgoteína. Cortes aún más estrechos, p.ej., de los tubos 88 a 92, proporcionan menores rendimientos de orgoteína de pureza todavía mayor.

EJEMPLO 3C - Cromatografía de Orgoteína Previamente purificada Procedente de Hígado de Buey.

Si se desea, una porción de las proteínas solubles extraídas del hígado como se ha descrito en el Ejemplo 1C se puede someter a un fraccionamiento de purificación previa con sulfato amónico. Se ajusta el lí

quide sobrenadante (aproximadamente 1600 ml, de pH 6,5 a 6,8) precedente del extracto centrifugado a pH 7,5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  3 N. Se añaden 25 g/100 ml de sulfato amónico sólido a la temperatura ambiente con agitación para llevar la solución a 40% de saturación. Se mantiene el pH a 7,5 todo el tiempo. Se agita durante 30 minutos más a la temperatura ambiente y se centrifuga luego el precipitado abundante a 20.000 G y 0°C durante aproximadamente dos horas. Se decanta el líquido sobrenadante y se valora a pH 5,0 (4°C) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%, añadiéndose después 22 g ó 35 g/100 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido a aquél en porciones, para llevar la concentración al 70% ó al 80% de la saturación. Se centrifuga el precipitado abundante a 20.000 G (0°C) durante 1 hora aproximadamente. Se desecha el líquido sobrenadante y se disuelve el precipitado en un volumen mínimo (100 ml) de agua desionizada. Se dializa en tampón de fosfato 0,005 M. (pH 6,0) hasta reacción negativa de  $\text{SO}_4^{=}$  (aproximadamente 6 cambios de 4 litros cada uno). Se clarifica por centrifugación a 20.000 G (0°C). Se ajusta el líquido sobrenadante a pH 6,0. Esta solución se puede aplicar luego a una columna cromatográfica de DEAE-celulosa de la manera descrita en el Ejemplo 1C.

25 Orgeteína Posteriormente purificada



Para producir ergoteína ultrapura, utilizan  
de un gel microporoso que actúa como un tamiz mole-  
cular, se disuelve el liofilizado de ergoteína obte-  
nido como se ha descrito arriba en el Ejemplo 1C en  
5 tampón 0,05 M de tris-HCl (pH, 7,5; KCl 0,15 M; gli-  
cina 0,005 M, azida de sodio al 0,02%,  $\text{Cu}^{++} 10^{-4}$ ,  $\text{Zn}^{++}$   
 $10^{-5}$ , 4°C) a una concentración de aproximadamente 70  
mg/ml. Se clarifica por centrifugación, si es necesar-  
rie, y se aplica a una columna de Sephadex G-75 (de  
10 3,2 x 96 cm, volumen de lecho aproximadamente 775 ml),  
calibrada con el mismo tampón que contiene  $\text{Cu}^{++} 10^{-4}$   
M y  $\text{Zn}^{++} 10^{-5}$  M. Se recoge el eluato en fracciones de  
5,4 ml y se miden las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  de las  
mismas. Comenzando aproximadamente en la fracción 50,  
15 estas absorbancias aumentan de repente y alcanzan un  
máximo al llegar aproximadamente a la fracción 68. Las  
fracciones 66-73 contienen una mayor parte de la erge-  
teína total en un estado ultrapuro. Hacia la fracción  
98, estas absorciones descienden a cero hasta llegar  
aproximadamente a la fracción 116. La única impureza  
20 importante aparece en los tubos 118-150.

La ergoteína obtenida de acuerdo con los  
ejemplos 1C-3C anteriores se puede purificar también  
por repetición de la cromatografía sobre una resina  
25 de intercambio de anión.



28 MAYO 1975

Para preparar la columna, se agitan 30 g de  
DEA-celulosa-52 Whatman, microgranular (W. & R. Balston,  
Hardstone, Kent, Inglaterra) en 300 ml de tampón de  
fosfato 0,1 M, a pH 6,0. Se deja que sedimente la sus-  
5 pensión y se decanta el líquido sobrenadante. Se añade  
tampón de fosfato 0,01 M, de pH 6,2, y se agita la mez-  
cla a fondo. Se deja que la suspensión sedimente duran-  
te 10 minutos y se decanta el líquido sobrenadante. Se  
lava la celulosa con el tampón de partida hasta que  
10 tanto el pH como la conductividad permanecen constantes  
en los valores correctos. Se aplica un vacío suave a  
la suspensión para eliminar el aire y el dióxido de car-  
bono ocluidos. La suspensión debería utilizarse inme-  
diatamente para el relleno de la columna. Si la resina  
15 se deja en contacto con tampones o polielectrolitos du-  
rante más de una semana, debe añadirse un agente de con-  
servación, p.ej., tolueno.

Se provee una columna de vidrio de 1,5 cm  
de diámetro con una red de nylon y se monta una unidad  
20 soporte de filtro Millipore en el fondo, verticalmente.  
Se llena la columna con tampón de fosfato sódico 0,01  
M, a pH 6,2, y se vierte la suspensión equilibrada y  
relativamente espesa de DEAE-celulosa (aproximadamente  
120-150 por ciento del volumen original) en la columna  
25 a través de un embudo unido al extremo superior de la



28 MAYO 1975

columna. Se mantiene la llave de fondo de columna cerrada hasta que se haya sedimentado en el fondo 1 cm de la celulosa, y luego se abre la llave de fondo de columna para dejar que se produzca un flujo libre. Se  
5 rellena una columna de aproximadamente 20 cm utilizando tiempos de sedimentación de 20-30 minutos. Se retiran los fines que sedimentan lentamente por el extremo superior de la columna, por aspiración. Se equilibra la columna haciendo fluir a su través el tampón  
10 de partida durante varias horas e durante una noche. Se controlan el pH y la conductividad del eluate para asegurar un equilibrio completo entre el intercambiador y el tampón. Se ajusta el caudal por presión hidrostática disponiendo la fuente de tampón aproximadamente a 40 cm por encima de la cabeza de la columna,  
15 lo cual producirá un caudal de aproximadamente 30 ml por hora para una columna de 1,5 cm de diámetro y 20 cm de altura, con un volumen de leche de 30 ml.

Se disuelven 100-200 mg de la ergoteína de  
20 partida en 2 a 4 ml de tampón de partida, y la solución verdosa resultante se deposita cuidadosamente en forma de capa sobre la superficie del leche. Después de la absorción, la solución de ergoteína aparece como una banda verdosa ancha cerca del extremo superior de la  
25 columna. Se conecta la columna al depósito de tampón

y se comienza la elución con tampón de fosfato 0,01 M, de pH 6,2. Se recogen fracciones de cinco mililitros, utilizando un colector de fracciones Simplex (B. Braun, Melsungen, Alemania Occidental). Se trabaja con la columna a la temperatura ambiente y se enfría el eluate con agua de hielo. Se separa una banda de color rosado pardusco de la zona de la muestra contenida en la columna por aplicación del tampón de elución, que se desplaza con rapidez hacia abajo y se eluye inmediatamente después del volumen vacío, requiriendo un volumen de tampón de 40-50 ml. Después de reunir las fracciones que contienen las impurezas que se eluyen con rapidez, se continúa la elución con tampón de fosfato 0,01 M, a pH 6,2, hasta un volumen total de aproximadamente 300 ml. Después de haberse recogido aproximadamente 120 ml de eluate, se eluye un material adicional con absorbancia menor pronunciada a 280 m $\mu$ . No pedría eluirse más material con tampón de fosfato 0,01 M, a pH 6,2.

La elución de la ergoteína se lleva a cabo por aumento escalonado o continuo de la concentración iónica del tampón. No se observa una elución importante hasta que la concentración iónica se aumenta a aproximadamente 0,015 M. Llegado este momento, la zona que queda en el extremo superior de la columna emigra hacia abajo en forma de una banda de color verde claro.

28 MAY 1975

Se consigue la elución completa con tampón 0,028 M.

Las fracciones de eluate que contienen la ergoteína se reúnen, se dializan extensamente y luego se liofilizan.

5                    En otro método de purificación posterior de la ergoteína, se añaden a los 550 ml sin dializar de eluate del Ejemplo 10 que contienen la ergoteína (concentración iónica de 0,018 a 0,028 M) 5 ml de acetate cuprese  $10^{-2}$  N y 5 ml de zinc  $10^{-3}$  M para llevar su  
10                    concentración en el eluate a aproximadamente  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , respectivamente. Llevar el eluate rápidamente a 75°C, y mantener a esta temperatura durante 15 minutos, preferiblemente en atmósfera de nitrógeno. Se enfría en baño de hielo a temperatura inferior a 10°C y se  
15                    separa el precipitado abundante, efectuándose después una diálisis contra agua desionizada. Se estabiliza por disolución en aquél de 180 mg de sacarosa. Se esteriliza por filtración a través de un filtro micropore pasando a una ampolla esterilizada para obtener una  
20                    solución estéril, la cual se puede liofilizar para dar ergoteína pura.

                    La ergoteína obtenida de acuerdo con el Ejemplo 10 se puede purificar posteriormente también con una columna de carboximetilcelulosa. Se preparó una  
25                    columna de CMC de 11 ml y se equilibró con acetate sódico



ce 0,01 molar, de pH 5,3. Se disolvieron 40 mg de la  
ergoteína purificada con DEAE-celulosa arriba indicada  
en tampón de acetato 0,01 molar, a pH 5,3, y se diali-  
zó contra varias cargas del mismo tampón. Los inselu-  
5 bles, en caso de existir, se separaron por centrifuga-  
ción y el líquido claro sobrenadante se depositó en  
forma de capa en el extremo superior de la columna de  
CMC. El caudal fue aproximadamente de 12 ml por hora.  
La columna se lavó con 30 ml de acetato 0,01 molar, a  
10 pH 5,3, para eluir las proteínas no adsorbidas. Se con-  
tinuó luego la elución con un gradiente lineal de ace-  
tato sódico 0,01 molar a 0,1 molar, a pH 5,3, en un ve-  
lumen total de 200 ml. Se eluyó ergoteína ultrapura en  
un intervalo comprendido entre 0,018 molar y 0,028 me-  
15 lar, y se aisló del eluate de la manera que se ha des-  
crito arriba.

EJEMPLO 1D - Cromatografía de Ergoteína Procedente de  
Sangre de Buey.

Se recoge sangre fresca de bovino (870 ml)  
20 en citrato sódico al 3,8% (0,5 vol/vol). Se centrifuga  
a 4000 revs. per min. a 0°C. Se desecha el plasma y se  
lavan los glóbulos rojos compactados (PRC) tres veces  
con solución salina al 0,9%. Se descomponen los glóbu-  
los rojos compactados por sedimentación durante 5 minu-  
25 tes a la temperatura ambiente (Biosenik III, ajuste Núm.



70). Se dializa primeramente contra agua destilada y luego contra tampón de fosfato 0,005 M, a pH 6,0 durante 24 horas a 4°C (4 sustituciones de 4 litros cada una); aumento de volumen, aproximadamente 110%.

5                    Se aplica el extracto dializado a una columna (de 2,5 x 30 cm; volumen de lecho, 147 ml) de DEAE-celulosa (DEAE-23 Fibrosa, Reeve-Angel) equilibrada con tampón de fosfato 0,005 M, a pH 6,0. Se revela la columna a un caudal de 240 ml/hr con tampón de fosfato 0,005 M. La mayor parte de la hemoglobina aparece en el volumen vacío, y el resto se separa con 230 ml adicionales (450 ml en total). La elución de la ergeteína se efectúa con 4 litros del mismo tampón que tiene una concentración de NaCl, que aumenta de 0 a 15    0,08 M. Se miden los contenidos de Cu y Zn y la absorbancia del eluate  $A_{265}$  y  $A_{280}$  como se ha descrito arriba. Aparecen tres picos principales, todos ellos con estructura fina, que comienzan a 575 ml, 750 ml y 20    1425 ml del eluate que aumenta escalonadamente. La ergeteína (segundo pico) está presente en la porción del eluate en la que la proporción de absorbancias  $A_{265}/A_{280}$  es 1,27 y los contenidos de Cu y Zn son máximos. La porción de 750 ml a 1030 ml (0,025 - 0,035 M) del eluate que aumenta escalonadamente contiene sustancialmente la totalidad de la ergeteína en un estado de pu- 25



reza elevada.

5 El espectro de la elución se muestra en la figura 1D, en la cual se representan los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del eluate. Como se ve en la figura, los contenidos de Cu y Zn comienzan a aumentar de repente hacia el tubo 60. En el tubo 70, comienza a aumentar la absorbancia  $A_{265}$ , y aproximadamente en el tubo 80 sobrepasa a la absorbancia  $A_{280}$ . Esta porción del eluate contiene ergeteína de la máxima pureza. El contenido de impurezas se eleva después como se deduce del aumento en las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  acompañado por una disminución en los contenidos de Cu y Zn. Se recoge el contenido de los tubos 10 70 a 92, y se aísla de los mismos la ergeteína.

15 Se dializa el corte de ergeteína contra agua desionizada a aproximadamente 0,3 a 0,45  $\mu$ mho, se filtra a través de un filtro de 0,45 micras, y se liofiliza. Se obtienen aproximadamente 52 mg de ergeteína, lo que equivale a un rendimiento de 0,013%, calculado 20 con respecto a los glóbulos rojos compactados, con actividad de sedasa de 2500 unidades/mg, lo que representa cerca del 75% de la actividad total de superóxido-dismutasa originalmente presente en el producto resultante de la retura de los glóbulos rojos, como se determina 25 por una combinación de los procedimientos de



McCord y Fridovich, JBC 244, 6049 (1969).

5 La columna se puede regenerar para volver a ser utilizada lavándola con tampón de una concentración iónica al menos 0,1 M y hasta 2 M, y enjuagándola después con agua desionizada.

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1D, se aísla ergoteína prácticamente pura a partir de glóbulos rojos de seres humanos, de conejo, de rata y de pello, respectivamente.

10 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1D, se obtienen resultados comparables utilizando TEAE-celulosa y una resina de dextrana reticulada que contiene grupos dietilaminoetilo (DEAE-Sephadex).

EJEMPLO 2D

15 Se sigue exactamente el procedimiento del Ejemplo 1D, excepto que la columna liberada de hemoglobina se libera de proteínas fácilmente eluibles con aproximadamente 500 ml de tampón de fosfato 0,005 M llevado a una concentración iónica 0,02 M con NaCl, se eluye la ergoteína con aproximadamente 1000 ml del mismo tampón llevado a una concentración iónica 0,035 M con NaCl, tomándose el corte de ergoteína de la porción del eluate en la que la proporción de absorbancias 20  $A_{265}/A_{280}$  es aproximadamente 1 ó mayor y los contenidos 25

de Cu y Zn son máximos, y la columna se lava con aproximadamente 1000 ml del mismo tampón llevado a una concentración iónica 0,1 M con NaCl.

EJEMPLO 3D

5

Se centrifugan, se descomponen y se dializan 2 unidades de sangre humana pasada de fecha en Anticoagulante ACD (1 unidad - 450 ml de sangre en 67,5 ml de ACD; 100 ml de ACD contienen 2,45 g de dextrosa, 0,80 g de ácido cítrico, y 2,2 g de citrato sódico, calculado en forma hidratada), como se ha descrito en el Ejemplo 1D.

10

Se aplica el extracto dializado a una columna (de 2,5 x 38 cm; volumen de lecho, 136,2 ml) de la misma DEAE-celulosa equilibrada empleada en el Ejemplo 1D. Se revela la columna como se ha descrito en el mismo. Se eluye la ergeteína con 6 litros del mismo tampón de fosfato 0,005 M que tiene una concentración de NaCl que aumenta desde 0 a 0,10 M. Se determinan los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del eluate como se ha descrito arriba. La ergeteína está presente en el primer máximo con una proporción  $A_{265}/A_{280}$  próxima a o mayor de 1,0 y en el que los contenidos de Cu y Zn son máximos. El certe eluide con un gradiente de NaCl 0,05 a 0,06 M (tubos 150-170, velu-

15

20

25



men total aproximadamente 200 ml), contiene sustancialmente la totalidad de la ergeteína en un estado de alta pureza.

5 Se dializa el certe de eluyente de ergeteína contra agua desionizada a aproximadamente 0,3 a 0,45 /umho; se filtra a través de un filtro de 0,45 micras, y se liofiliza. Se obtienen aproximadamente 60 mg de ergeteína (0,0125%, calculado sobre los glóbulos rojos compactados).

10 Se obtienen resultados comparables por un revelado escalonado de la columna con tampón de fosfato 0,005 M que contiene aproximadamente una concentración 0,015 M de NaCl para separar las proteínas que se eluyen más fácilmente que la ergeteína, con tampón que  
15 contiene aproximadamente una concentración 0,03 M de NaCl para eluir la ergeteína, y con tampón que contiene aproximadamente una concentración 0,1 M de NaCl para lavar la columna.

20 EJEMPLO 4D

Se emplean 1100 ml de sangre fresca de conejo en citrato sódico al 3,8% (0,5 vol/vol). Se centrifuga, se descomponen los glóbulos rojos y se dializa como se ha descrito en el Ejemplo LD (aumento de volumen, aproximadamente un 100%).  
25

Se aplica el extracto dializado a una columna (de 2,5 x 41 cm, volumen de lecho 201 ml) de la misma DEAE-celulosa empleada en el Ejemplo 1D. Se revela la columna como se ha descrito en dicho Ejemplo.

5 La mayor parte de la hemoglobina aparece en el volumen vacío, y el resto se elimina con 500 ml adicionales (650 ml en total). Se eluye la orgoteína con 3 litros del mismo tampón de fosfato 0,005 M que tiene una concentración que aumenta desde 0 a 0,08 M. Se determinan

10 los contenidos de Cu y Zn y las absorbancias  $A_{265}$  y  $A_{280}$  del eluato como se ha descrito arriba. La orgoteína está presente en el primer pico, con una proporción  $A_{265}/A_{280}$  próxima a o mayor de 1,0, y los contenidos en  $Cu^{++}$  y  $Zn^{++}$  con absorbancia máxima. El corte

15 eluido con un gradiente de NaCl 0,020 a 0,030 M (tubos 60 a 90, volumen total aproximadamente 240 ml) contiene sustancialmente la totalidad de la orgoteína en un estado de alta pureza.

Se dializa el corte de orgoteína contra agua desionizada a aproximadamente 0,3 a 0,45  $\mu$ mho, se filtra a través de un filtro de 0,45 micras, y se liofiliza. Se obtienen aproximadamente 45 mg de orgoteína (0,01%), calculada sobre los glóbulos rojos compactados. En porciones adyacentes del eluato existe orgoteína

25 adicional de menor pureza.



Se obtienen resultados semejantes por un re-  
velado escalonado de la columna con tampón de fosfato  
0,005 M que contiene aproximadamente una concentración  
0,015 M de NaCl para separar proteínas más fácilmente  
5 eluidas que la orgoteína, con un tampón que contiene  
aproximadamente una concentración 0,02 M de NaCl para  
eluir la orgoteína, y con un tampón que contiene apro-  
ximadamente una concentración 0,1 M de NaCl para la-  
var la columna.

10

#### Orgoteína Post-purificada

La orgoteína obtenida de acuerdo con el pro-  
cedimiento de los ejemplos anteriores se puede purifi-  
car adicionalmente por cromatografía en estado de gel  
15 sobre tamices moleculares en una columna (de 3,2 cm  
x 88,5 cm; volumen total de lecho, 711,5 ml; volumen  
vacío 265,5 ml) de resina de dextrana reticulada con epi-  
clorhidrina Sephadex G-75 Superfina (Farmacia, Suecia),  
recogiéndose el eluato en fracciones de 5,4 ml y deter-  
20 minándose las absorciones  $A_{265}$  y  $A_{280}$  de dichas frac-  
ciones. Comenzando aproximadamente en la fracción 50,  
estas absorciones aumentan de repente y alcanzan un va-  
lor máximo aproximadamente para la Fracción 68. Las  
fracciones 66 a 73 contienen una mayor parte de la or-  
25 goteína total en un estado ultrapuro. Al llegar a la

28 MAY 1972



Fracción 98, estas absorciones caen a cero hasta aproximadamente la Fracción 116. Las únicas impurezas de importancia aparecen en los tubos 118-150.

5 La orgoteína obtenida de acuerdo con el Ejem-  
plo 1D se puede post-purificar también con ayuda de  
una columna de carboximetilcelulosa. Se preparó una  
columna de CMC de 11 ml y se equilibró con acetato  
sódico 0,01 molar, a pH 5,3. Se disolvieron 40 mg de  
la orgoteína purificada con DEAE-celulosa arriba in-  
10 dicada en tampón de acetato 0,01 molar, a pH 5,3, y  
se dializó contra varias sustituciones del mismo tam-  
pón. Los insolubles, en caso de existir, se separaron  
por centrifugación y el líquido claro sobrenadante se  
depositó en forma de capa en el extremo superior de  
15 la columna de CMC. El caudal fue aproximadamente de 12  
ml por hora. Se lavó la columna con 30 ml de acetato  
0,01 molar, a pH 5,3, para eluir las proteínas no ad-  
sorbidas. La elución se continuó con un gradiente li-  
neal de acetato sódico de concentración comprendida en-  
20 tre 0,01 molar y 0,1 molar, a pH 5,3, en un volumen  
total de 200 ml. Se eluyó orgoteína ultrapura a una con-  
centración comprendida entre 0,018 molar y 0,028 mo-  
lar, y se aisló del eluato de la manera arriba descri-  
ta.

25 La presente solicitud que corresponde a la

16.12.72



28 MAYO 1975

5 presentada en Estados Unidos de América, con fecha 7 de Diciembre de 1.971, bajo el Número 205.609 y 205.610 y 19 de Julio de 1.972, bajo el Nº 273.278 y 273.277, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

- REIVINDICACIONES -

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Un procedimiento para el aislamiento de orgoteína a partir de una mezcla de proteínas solubles, que comprende calentar al menos la porción de los glóbulos rojos de la sangre integral a un pH comprendido entre 5 y 8 y a una temperatura de aproximadamente 60 a 80°C, con lo que precipita la hemoglobina; enfriar la mezcla calentada; separar las proteínas precipita-

25

26-5-75

*Ray*



1975

das de la mezcla calentada; y separar la orgoteína del líquido sobrenadante.

5 2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los glóbulos rojos son de bovino.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que se emplea sange integral como material de partida.

10 4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, que comprende diluir el material de partida para la etapa de calentamiento con hasta aproximadamente 3 volúmenes de agua antes del calentamiento.

15 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que los glóbulos rojos se calientan a un pH de aproximadamente 6,8 a 7,4.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la etapa de calentamiento se lleva a cabo a aproximadamente 65-75°C.

20 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6ª, en el que la etapa de calentamiento se lleva a cabo a aproximadamente 75°C durante aproximadamente 1 a 2 horas a un pH de aproximadamente 6,8 a 7,4.

25 8ª.- Un procedimiento para el aislamiento de orgoteína a partir de una mezcla de proteínas solubles.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que

26-5-75



antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de noventa y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, **28 MAYO 1975**

P.A.

**Alberto de Elizaburu**

Por Poder.

26-5-75  
VGD.

- 95 -

*Rg*

23 JUN 1977

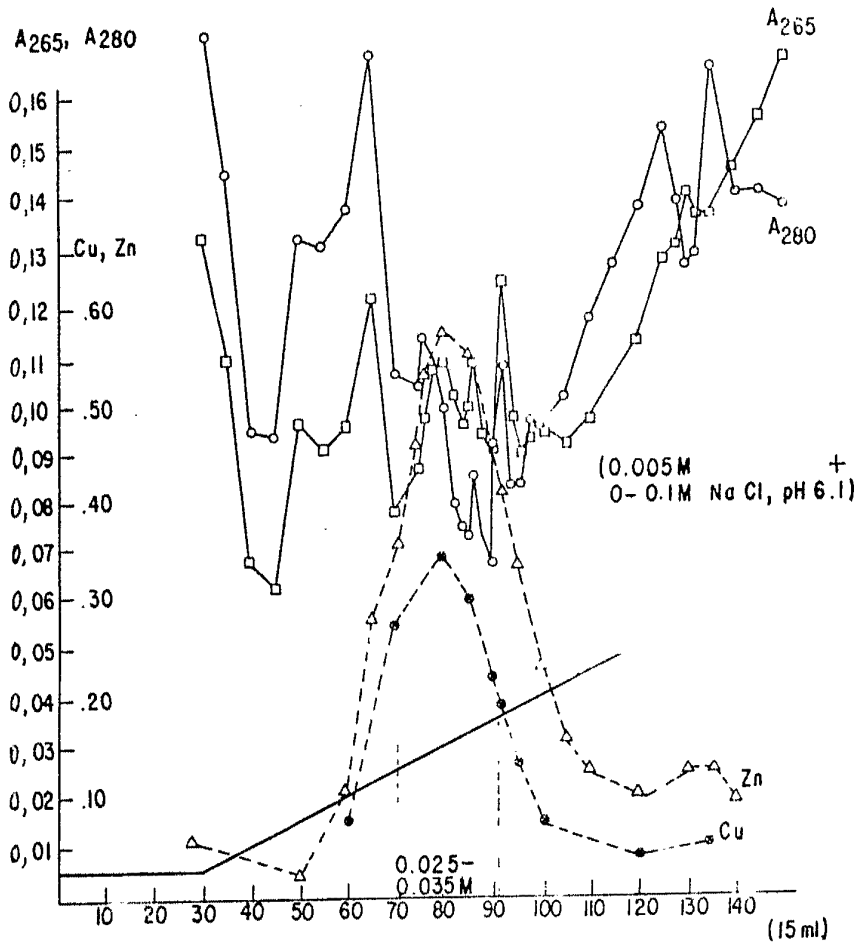


FIG. 1D

*True*



23 JUN

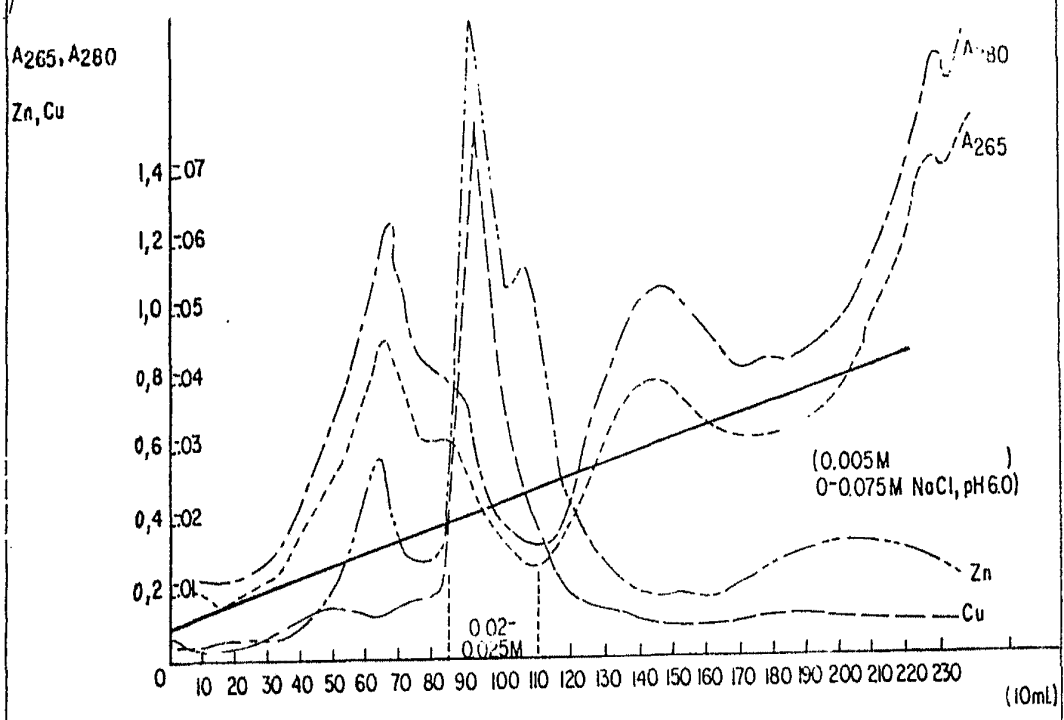


FIG. 2C

Alberto de E...  
For For...