



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO 462.069	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION 2-Setiembre-1.977.	

462069

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO P 26 40 387.2	32 FECHA 8-9-76	33 PAIS Rep.Fed.Alemana
---	--------------------	----------------------------

41 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G/A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	---	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE PROTEINA DE TEJIDOS"
---

71 SOLICITANTE (S) BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 76/B 019)
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana
---

72 INVENTOR (ES) Dr. Hans Bohn y Wilhelm Winckler
--

73 TITULAR (ES)
-----------------

74 REPRESENTANTE ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 66.751)
--

IAR.

La invención se refiere a una proteína específica de tejidos, es decir a una sustancia que es componente de tejidos de órganos, y a un procedimiento para su obtención.

5 A partir de órganos desintegrados de mamíferos se pueden aislar varias sustancias ya descritas, en forma relativamente pura. Es conocida por ejemplo la proteína ferritina ferruginosa, que puede obtenerse a partir de tejido de placentas, pero también se ha detectado su presencia en el estómago, bazo, hígado, riñones, útero y pulmón.

Objeto de la invención es una nueva proteína de tejidos. Se caracteriza ésta por una porción proteínica, que comprende fundamentalmente aminoácidos tipo  $\alpha$ , de  $94 \pm 3\%$ ;

15 una porción de hidratos de carbono de  $5,4 \pm 2,2\%$ , de ella hexosas  $3,0 \pm 1\%$ , hexosamina  $1,2 \pm 0,5\%$ , fucosa  $0,2 \pm 0,2\%$ , ácido neurámico  $1,0 \pm 0,5\%$ ,

un coeficiente de sedimentación  $S_{20,w}^{c=0,1}$  de  $3,5 S \pm 0,5 S$ ,

20 un punto isoeléctrico de  $4,9 \pm 0,3$ , medido con placas de gel de poliamida, y de  $4,5 \pm 0,3$  medido en una columna de enfoque eléctrico

una movilidad electroforética en la gama de las globulinas  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ ,

25 un coeficiente de extinción  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (278 nm) de  $11,9 \pm 1,0$  y una reacción inmunológica específica con un anticuerpo dirigido específicamente contra la proteína.

Como distintivo especial de la nueva proteína de tejidos se puede afirmar que se puede detectar su presencia tanto en órganos fetales como también en órganos

adultos de mamíferos. En los primates, especialmente en el ser humano, la proteína ha sido detectada en los siguientes órganos fetales: corazón, hígado, riñones, pulmón, estómago, cerebro, además en los siguientes órganos adultos: corazón, pulmón, piel, estómago, riñones, útero, hígado, bazo, glándulas suprarrenales, colon, recto, vejiga. Con métodos inmunológicos cuantitativos se pueden detectar en este caso generalmente por lo menos 10 mg de la proteína en 100 g de tejido. También en la placenta está presente el producto en el orden de 10 mg/100 g de tejido. Sin embargo la placenta se aconseja especialmente para el aislamiento de la proteína. En eritrocitos se puede detectar un contenido de 1 mg de proteína/100 ml de eritrocitos, pero en cambio no se puede detectar la proteína en el plasma o suero de personas sanas.

Para aclarar las características distintivas de la proteína se puede citar lo siguiente:

La determinación del coeficiente de sedimentación se efectuó en una ultracentrífuga analítica a 60.000 revoluciones/minuto en celdas de sector doble con ayuda de las bandas de la substancia que se desplazan en el ultravioleta con la longitud de onda de 280 nm, utilizando agua como disolvente y una concentración de proteína de 1 mg/ml en una celda de sedimentación en capas de una ultracentrífuga analítica ayudándose de lo descrito en Vinograd, Proc. Acad. Sci. USA, 49, 902 (1963).

El peso molecular se calculó por una parte en la ultracentrífuga por medio de la determinación del equilibrio de sedimentación según Yphantis. Resultó un valor de  $37.100 \pm 1.400$ .

Por otra parte en la investigación de la proteína en un gel portador que contiene 0,1% de dodecil sulfato sódico, que consiste en poliacrilamida, la mayor parte de la proteína se descompuso en dos subunidades con un peso molecular de  $22.000 \pm 2.000$ . De aquí se puede deducir respecto a la proteína nativa un peso molecular de  $44.000 \pm 4.000$ .

Para determinar el punto isoeléctrico se aplicó el procedimiento del enfoque isoeléctrico utilizando aparatos y reactivos vendidos para esto por la firma LKB, Estocolmo.

Si se utilizan placas de gel de poliamida de la firma LKB, resulta un punto isoeléctrico de  $4,9 \pm 0,3$ , pero si se aplica en cambio una columna de enfoque eléctrico de la misma firma con los reactivos recomendados para esto se encuentra un punto isoeléctrico de  $4,5 \pm 0,3$  en relación con la proteína según la invención.

La movilidad electroforética se determinó utilizando acetato de celulosa como lámina portadora.

Los hidratos de carbono se determinaron según Schultze, H.E.; Schmidtberger, R.; Haupt, H.; Untersuchungen über die gebundenen Kohlenhydrate in isolierten Plasmaproteinen. Biochem. X., 329, 490, (1958).

Un análisis de aminoácidos se efectuó según Moore, S.; Spackmann, D.H.; Stein, W.H.; Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. Anal. Chem., 30, 1185, (1958) utilizando un cromatógrafo de líquido.

Aquí se manifestó que los aminoácidos representados con la mayor frecuencia en la cadena peptídica

son leucina, ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.

La caracterización inmunológica de la sustancia se efectúa de la manera más sencilla según un procedimiento de difusión conocido, en el que el antígeno, es decir la proteína, y un anticuerpo dirigido contra la proteína, o el antisuero no enriquecido con respecto al anticuerpo, se difunden uno, respecto al otro en un medio portador tal como por ejemplo agua. Si ambos componentes de la reacción se encuentran mutuamente en una proporción favorable, se forma un precipitado visible. Según este conocimiento es evidente para el técnico que todas las técnicas inmunológicas se pueden utilizar para la detección y para la determinación tanto de la nueva proteína de tejidos como también de los anticuerpos dirigidos contra la proteína de tejidos.

Objeto de la invención son además procedimientos para la obtención de la proteína caracterizada anteriormente, que se distinguen por el hecho de que extractos de órganos, generalmente extractos acuosos de órganos, que contienen esta proteína, se fraccionan tomando como base los siguientes criterios hallados según la invención:

La proteína puede ser precipitada con sales neutras. Con el sulfato de amonio utilizado habitualmente para esta clase de precipitaciones se precipita la proteína con una concentración de saturación de la sal de 30 a 60% en una gama de pH próximos al punto neutro.

Según su peso molecular la proteína puede obtenerse mediante medidas que son adecuadas para la separación de sustancias con pesos moleculares comprendidos entre 35 y 50.000. Para esto se utilizan ventajosamente

los métodos de la filtración a través de gel o de la ultrafiltración.

La proteína de tejidos, con un valor de pH neutro o ligeramente alcalino, se adsorbe en intercambiadores de iones débilmente básicos, utilizándose ventajosamente en este caso una solución tampón comparativamente poco concentrada, pues mediante aumento de la concentración de sal o también disminuyendo el valor de pH se puede impedir la adsorción. Por otra parte, conociendo este comportamiento, se ofrece la posibilidad de adsorber la proteína de tejidos y de volver a eluirla utilizando soluciones salinas más concentradas o soluciones tampón con valores de pH reducidos.

Se ha puesto de manifiesto que la proteína de tejidos no se precipita con las bases orgánicas solubles en agua de las series de acridina y quinoleína, que se utilizan habitualmente para procedimientos de precipitación de proteínas. En la concentración habitual en estos procedimientos aquélla permanece en la porción sobrenadante acuosa. Según esto se puede utilizar para la precipitación de proteínas acompañantes por ejemplo una base acridínica, tal como el lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina o una base quinoléica tal como clorhidrato de bis-(2-metil-4-aminoquinoleil-6)-carbamida, permaneciendo en la porción sobrenadante la proteína de tejidos según la invención.

Similares consideraciones pueden aplicarse al utilizar hidroxilapatito como adsorbente para proteínas. La proteína de tejidos no presenta ninguna afinidad especial con el hidroxilapatito, y en cambio una serie de proteínas acompañantes es retenida por el hidroxilapatito.

Sobre la base del conocimiento de la movilidad electroforética se puede utilizar la electroforesis preparativa por zonas para el enriquecimiento, o aislamiento, de la proteína de tejidos.

5 La afinidad de la proteína de tejidos en virtud de su comportamiento inmunológico se puede utilizar para enriquecer la proteína con ayuda de los llamados procedimientos de inmunoadsorción. Para esto se puede obtener de forma en sí conocida un inmunoadsorbente, es  
10 decir un anticuerpo fijado a un portador, contra la proteína de tejidos, que sea capaz de fijar específicamente la proteína de tejidos. La proteína puede eluirse nuevamente después de esto modificando las condiciones del medio.

15 Mediante una combinación selecta de los métodos mencionados, que conducen por una parte al enriquecimiento de la proteína de tejidos y por la otra a su separación de las restantes proteínas acompañantes, puede tener lugar el aislamiento de la substancia según la invención. En consecuencia, como objeto de la presente invención  
20 deberán considerarse las diversas etapas de enriquecimiento, para la proteína de tejidos y los procedimientos para su purificación resultantes gracias a la combinación de las medidas para el enriquecimiento.

25 El procedimiento para el enriquecimiento se caracteriza por la aplicación de al menos una de las medidas siguientes a extractos de órganos o a soluciones obtenidas a partir de ellos, que contienen la proteína de tejidos  
30 a aislar y por la obtención subsiguiente de la fracción enriquecida con respecto a la proteína de tejidos:

5 a) Adición de derivados solubles en agua de una base acridínica o quinoleínica, preferentemente del lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, en la gama de valores de pH de 5 a 10, preferentemente a pH 8 aproximadamente, hasta una concentración final de alrededor de 0,8% (peso respecto a volumen), permaneciendo esencialmente en la porción sobrenadante la proteína de tejidos.

10 b) Adición de sales neutras hasta la precipitación de la proteína de tejidos, preferentemente del sulfato de amonio a un valor de pH aproximadamente neutro hasta 30 - 60% de la concentración de saturación del sulfato de amonio.

15 c) Adsorción de la proteína de tejidos en un intercambiador de iones débilmente básico, como dietilaminoetilcelulosa, con una conductividad de la solución de 0 a 2 mS y un valor de pH neutro o débilmente alcalino, por ejemplo utilizando un tampón aproximadamente 0,01 M con el valor de pH de aproximadamente 8. Un tampón que se ha de usar preferentemente es tris-hidroximetilaminometano-HCl. La elución de la proteína de tejidos puede lograrse mediante desplazamiento del valor de pH a  $< \text{pH}$  7,0 o mediante aumento de la conductividad a  $> 5 \text{ mS}$ .

20 d) Separación en virtud del tamaño molecular (fraccionamiento por tamiz molecular). Es especialmente adecuada la filtración a través de gel en una columna, llena con un polímero de tamaño de poros adecuado, por ejemplo de dextrana reticulada con epíclorhidrina, que es fabricado como SEPHADEX<sup>(R)</sup> por la firma Pharmacia, Uppsala, con el objeto de enriquecer proteínas con un peso molecular de aproximadamente 50.000. Sin embargo, se pueden

30

utilizar también productos tales como ULTROGEL<sup>(R)</sup> de LKB, Bromma o BIO-GEL P<sup>(R)</sup> de Bio-Rad Laboratories, Richmond, California.

5 e) Realización de una adsorción con hidroxilapatito. Como en condiciones que se observan habitualmente en la bioquímica preparativa la proteína de tejidos no es fijada por el hidroxilapatito, éste es un agente adecuado para eliminar de la solución proteínas acompañantes de la proteína de tejidos. La solución de proteína de tejidos se regula convenientemente para esto a un valor de 10. pH en torno al punto neutro y la conductividad de la solución se mantiene en 1 mS aproximadamente.

f) Electroforesis preparativa en zonas.

15 La solución que contiene la proteína, que es adecuada para la realización de una electroforesis de proteínas, preferentemente una solución tampón alcalina, por ejemplo un tampón de dietilbarbiturato sódico con el pH 8,6, intensidad iónica =0,1, se introduce para esto en un aparato para la electroforesis preparativa, tal como se describe por ejemplo por N. Heimburger y R. Schmidtberger 20 en Behringwerke-Mitteilungen, cuaderno 43, páginas 83 y siguientes, especialmente en las páginas 119-120. Este aparato consiste en la disposición horizontal de una electroforesis a través de portador en una cuba abierta, en la 25 que el material portador se enfría hasta por debajo de 10°C para evacuar el calor de Joule que aparece durante la electroforesis. Como material portador sirven sustancias indiferentes respecto a proteínas, ventajosamente poli(cloruro de vinilo), o sus copolímeros en forma de un granulado fino. 30

Es recomendable efectuar la electroforesis en el margen alcalino de pH, ventajosamente a un pH de aproximadamente 8,6, con una intensidad iónica de 0,08 a 0,12 y con una intensidad de campo de 4-6 voltios/cm. Si se utiliza tampón 0,1 M de dietilbarbiturato sódico con el valor de pH 8,6 la proteína de tejidos se desplaza en el campo eléctrico en la zona de las proteínas de plasma clasificable como zona  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ .

Para la obtención de la  $\alpha$ -globulina de elevado peso molecular se separa por corte esta zona y se eluye respecto de material portador inerte con ayuda de agua o de soluciones salinas acuosas, por ejemplo de una solución de sal común al 0,5 a 1%. En una última etapa de purificación el eluato se puede someter ventajosamente a una filtración a través de gel, por ejemplo sobre un ultrafiltro, después de una concentración previa.

Para la obtención de la nueva proteína de tejidos se combinan entre sí varias de las medidas citadas y se vuelve a tratar en tal caso cada vez la fracción que contiene la proteína de tejidos, mientras que se desechan las restantes fracciones.

Sin que haya que deducir de ello restricción alguna, a continuación se va a mostrar a modo de ejemplo una posibilidad sobre cómo se puede obtener la proteína de tejidos a partir de un tejido de órganos.

Para ello se desmenuzan por ejemplo placentas humanas y se extraen con agua o con una solución salina diluida, convenientemente inferior al 10%, ventajosamente con una solución de sal neutra al 0,5%, como por ejemplo de cloruro de sodio. Convenientemente por 1 kg de placen-

tas aproximadamente se emplearán 1 a 5 litros de las soluciones de extracción. Las porciones no disueltas se separan del extracto mediante centrifugación o filtración.

5

Se ha manifestado ventajoso efectuar los trabajos durante la obtención de la proteína de tejidos por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo a 10°C.

10

El extracto de placenta desde neutro a ligeramente alcalino, ajustado preferentemente a pH aproximadamente 8 se mezcla a continuación con un derivado soluble en agua de una base acridínica, por ejemplo con el lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina, hasta una concentración de

15

0,8 ± 0,4% o con un derivado soluble en agua de una base quinoleínica, ventajosamente con clorhidrato de bis-(2-metil-4-aminoquinoleil-6)-carbamida hasta una concentración de 0,3 ± 0,15%. El precipitado que se forma en este caso se desecha. La porción sobrenadante contiene la parte principal de la proteína de tejidos que se ha de enriquecer.

20

Después de esto es conveniente separar el agente precipitante en exceso mediante adición de compuestos que son capaces de formar un precipitado con el agente precipitante. Las bases acridínicas forman, por ejemplo con halogenuros, compuestos difícilmente solubles, por lo que se aconseja utilizar cloruro de sodio para la separación

25

de la base acridínica. Se consigue una separación satisfactoria con una concentración de aproximadamente 3 a 7% (peso:volumen) de cloruro de sodio. A la solución de proteína sobrenadante se añade a continuación una cantidad

30

de una sal utilizable para la precipitación de sustancias proteicas suficiente para que la proteína de tejidos se

expulsa de la solución. Como sal se utiliza ventajosamente sulfato de amonio: para esto se utiliza convenientemente una concentración de saturación del sulfato de amonio de 30 a 60%, preferentemente de 40 a 50%. El precipitado que se forma tras la adición del sulfato de amonio se obtiene mediante centrifugación o filtración, y se disuelve nuevamente en agua. Como tales precipitados obtenidos mediante precipitación salina siguen incluyendo por su parte generalmente todavía agente precipitante, es recomendable efectuar a continuación una diálisis. La solución frente a la cual es dializada la solución de proteína es convenientemente una solución tampón poco concentrada. Es oportuno utilizar aquí soluciones tampón que son habituales en la cromatografía por intercambio de iones y que permiten una adsorción de la proteína de tejidos en un intercambiador de iones débilmente básico.

La solución dializada de la proteína de tejidos se mezcla a continuación en un medio tampón poco concentrado con el intercambiador de iones débilmente básico, por ejemplo dietilaminoetilcelulosa y después de efectuada la adsorción de la proteína de tejidos en el intercambiador de iones éste se separa, por ejemplo, se filtra de la solución restante. Si la adsorción se efectuó por ejemplo en un medio ligeramente alcalino (aproximadamente pH 8,0) y un tampón con la concentración de 0,01 moles/litro, se puede efectuar un lavado del intercambiador de iones con un tampón 0,02 molar con un valor de pH algo reducido (por ejemplo 6-7). La concentración de sal del tampón de elución puede ser en total de aproximadamente 0,2 moles/litro.

Es ventajoso mezclar el eluato, de manera similar a la descrita anteriormente, con una cantidad de sal neutra tal que la proteína pueda obtenerse a partir de la solución diluida como precipitado y a continuación en forma concentrada, una vez que ha sido disuelta nuevamente. Para una purificación adicional se puede someter a la proteína, nuevamente disuelta, a una filtración a través de gel. Se obtienen fracciones enriquecidas de manera especialmente buena con respecto a la proteína de tejidos buscada, si se utiliza para ello la dextrana reticulada de la firma Pharmacia, SEPHADEX<sup>(R)</sup> del tipo G 150, convenientemente en forma de medidas de una cromatografía de columna. Para la elución pueden servir soluciones tampón usuales en la bioquímica, a las que se les pueden añadir sales neutras para aumentar el efecto de fraccionamiento, por ejemplo tampón 0,01 - 0,1 m de tris-hidroximetil-aminometan-ácido clorhídrico con adición de NaCl 0 - 5 m con valor de pH desde aproximadamente neutro a básico. En este procedimiento de elución se busca la proteína de tejidos en las fracciones eluidas, convenientemente con procedimientos inmunológicos, tras lo cual se separan y se recogen las fracciones que contienen la proteína según la invención.

Como los eluatos de filtración a través de gel contienen también la proteína de tejidos en forma diluida, también aquí está indicado un enriquecimiento mediante precipitación con sales neutras, tal como se ha descrito.

La solución de proteína de tejidos obtenida mediante nueva disolución del precipitado salino se regula mediante diálisis frente a una solución tampón muy intensamente diluida a las condiciones que son idóneas para adsor-

ber en hidroxilapatito el mayor número posible de las impurezas todavía presentes. Aquí son adecuados especialmente tampones de fosfato débilmente concentrados, por ejemplo un tampón de fosfato sódico aproximadamente 0,005 molar, cuyo valor de pH está comprendido entre 6,5 y 7,0. Al producirse contacto del hidroxilapatito con la solución de proteína presente, la proteína de tejidos según la invención se queda en gran parte en solución, de manera que el hidroxilapatito, con el que está llena convenientemente una columna, no deberá tenerse ya en cuenta para el procedimiento siguiente. La fracción pasada a través de la columna de hidroxilapatito contiene la proteína de tejidos buscada en forma nuevamente enriquecida y purificada.

Una repetición de la cromatografía por intercambio de iones, en la que - a diferencia de la etapa descrita anteriormente - se llena una columna con el intercambiador de iones, la solución que contiene la proteína de tejidos se aplica sobre la columna y se eluye con una solución salina de concentración creciente (gradiente), conduce a enriquecimientos adicionales de la proteína de tejidos. El procedimiento de purificación efectuado según estas etapas mostradas a modo de ejemplo conduce a la proteína de tejidos en una pureza de >99%.

La proteína de tejidos se puede obtener también evidentemente según lo dicho anteriormente en la misma pureza mediante combinación de otras etapas, por ejemplo, también intercalando una etapa de la electroforesis preparativa o de la inmunoadsorción.

La proteína de tejidos obtenida según la invención tiene propiedades antigénicas. Una inmunización de

animales según métodos conocidos efectuada con ella condujo a la formación de anticuerpos específicos en la sangre de los animales inmunizados. Los sueros de éstos pueden obtenerse según procedimientos usuales y enriquecerse los anticuerpos contenidos en ella.

La especificidad para tejidos comprobada de la sustancia según la invención sugiere un significado para diagnóstico. Las enfermedades de tejidos se pueden detectar en la sangre por la salida de la proteína desde el tejido al torrente circulatorio. Para esto entran en consideración esencialmente los conocidos procedimientos inmunológicos de detección utilizando los anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína de tejidos.

La invención se explica más detalladamente en el ejemplo siguiente:

#### Ejemplo

150 kg de placentas congeladas a baja temperatura se desmenuzan y se extraen con 150 litros de una solución acuosa al 0,5% de cloruro de sodio. El extracto se regula con hidróxido sódico 2 n a pH 8 y se mezcla con 50 litros de una solución acuosa al 3% de lactato de diaminoetoxiacridina. Tras un período de espera de 1 hora se sifona la porción sobrenadante que contiene la proteína de tejidos, se mezcla con 5% de cloruro de sodio sólido (11 kg) para la separación del lactato de diaminoetoxiacridina que ha quedado todavía en la solución, se filtra y se mezcla con 30% -en relación con el peso del líquido- de sulfato de amonio sólido y se agita bien a fondo. Al cabo de 1 hora se separa el precipitado mediante filtración.

500 g del precipitado recogido sobre el filtro se disuelven en 500 ml de agua destilada y se dializan frente a una solución tampón 0,01 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano-ácido clorhídrico con el valor de pH 7,0 que contiene 0,05% de azida de sodio. La solución dializada se centrifuga y la porción sobrenadante se completa hasta 2.000 ml con la misma solución tampón, con solución 0,1 n de hidróxido sódico se regula a pH 8,0, y se mezcla agitando con 500 g de dietilaminoetilcelulosa húmeda (firma Serva, Heidelberg), durante 1 hora.

A continuación la dietilaminoetilcelulosa se separa de la solución mediante filtración, se lava dos veces cada vez con 1 litro de tampón 0,01 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano-ácido clorhídrico con el valor de pH 8,0 y a continuación se eluye tres veces con 500 ml de tampón 0,02 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano-ácido clorhídrico, de pH 6,5, que contiene 0,85 % de cloruro de sodio y 0,05% de azida de sodio.

A los eluatos unidos se añade 30% de sulfato de amonio, referido al peso del líquido, y se agita el conjunto. El precipitado, que contiene la proteína de tejidos, se disuelve en 300 ml de agua destilada y se somete a la filtración a través de gel por medio de SEPHADEX G-150 utilizando tampón 0,1 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano-ácido clorhídrico de pH 8,0, que contiene 1,0 moles de cloruro de sodio/litro (100: columna de 20 cm). En este caso el tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano sirve primeramente como medio de suspensión, en el que está presente el portador para la filtración a través de gel - es decir el SEPHADEX<sup>(R)</sup> G 150. La proteína de tejidos

disuelta en agua destilada se aplica a la columna llena con SEPHADEX<sup>(R)</sup> y se eluye con el mencionado tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano.

5 A continuación se ensayan los eluatos con antisuero específico de proteína de tejidos, se recogen las fracciones que contienen proteína de tejidos y a partir de ellas se precipitan una vez más las proteínas, como se ha descrito anteriormente, con 30% de sulfato de amonio sólido.

10 La purificación adicional se efectúa en hidroxilapatito (columna de 3 x 23 cm) utilizando un tampón 0,005 M, de fosfato pH 6,8, y a continuación mediante cromatografía en SEPHADEX<sup>(R)</sup> de dietilaminoetilo (Pharmacia) (columna de 3 x 23 cm) utilizando un tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano-HCl, pH 7,0. Para la elución se aplica un gradiente de sal con 0 a 2% de NaCl. Se obtienen 40 mg de la nueva proteína de tejidos con una pureza de 99,5%.

El análisis de aminoácidos deparó los siguientes valores (porcentaje molar).

20	Lisina	5,64	Alanina	7,51
	Histidina	1,05	Cistina/2	2,11
	Arginina	3,83	Valina	6,68
	Acido aspártico	9,84	Metionina	0,98
	Treonina	4,33	Isoleucina	3,32
25	Serina	4,78	Leucina	14,43
	Acido glutámico	11,29	Tirosina	5,10
	Prolina	6,41	Fenilalanina	3,08
	Glicina	8,65	Triptófano	1,14

1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

1ª.- Procedimiento para el enriquecimiento de proteína de tejidos que presenta a) una porción proteínica de  $94 \pm 3\%$ ; un contenido de hidratos de carbono de  $5,4 \pm 2,2\%$ , y de ellos hexosas  $3,0 \pm 1\%$ , hexosamina  $1,2 \pm 0,5\%$ , fucosa  $0,2 \pm 0,2\%$ , ácido neurámico  $1,0 \pm 0,5\%$ ; b) un coeficiente de sedimentación  $S_{20,w}^{c=0,1}$  de  $3,5 \pm 0,5 S$ ; c) un punto isoeléctrico de  $4,9 \pm 0,3$ , medido con placas de gel de poliacrilamida, y de  $4,5 \pm 0,3$ , medido en una columna de enfoque eléctrico; d) una movilidad electroforética en la gama de las glubulinas  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ ; e) un coeficiente de extinción  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (278 nm) de  $11,9 \pm 1,0$ , caracterizado por el hecho de que extractos de órganos o soluciones obtenidas a partir de ellos, que contienen esta proteína, se someten por lo menos a una de las medidas siguientes, y se obtiene la fracción enriquecida con respecto a la proteína de tejidos: a) adición de derivados solubles en agua de una base acridínica o quinoleínica en la gama de valores de pH 5 a 10 hasta una concentración final de aproximadamente  $0,8\%$ ; b) adición de sales neutras hasta la precipitación de la proteína de tejidos; c) adsorción de la proteína de tejidos en un intercambiador de iones débilmente bá-

15

20

25

30

24.11.77

1 -sico y elución de éste; d) fraccionamiento por tamiz mole-  
cular y obtención de las fracciones que corresponden a un  
5 peso molecular de aproximadamente 50.000; e) adsorción en  
hidroxilapatito evitando la fijación de la proteína de te-  
jidos; f) electroforesis preparativa en zonas y obtención  
de la zona intermedia  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ .

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª  
caracterizado por el hecho de que como extracto de órganos  
se utiliza un extracto de placentas humanas.

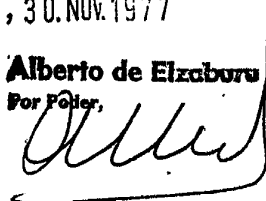
10 3ª.- Procedimiento para el enriquecimiento de  
proteína de tejidos.

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

15 Esta Memoria consta de dieciocho hojas escri-  
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30. NOV. 1977

P.A. **Alberto de Elzaburu**  
Por Poder.



20

25

30

24.11.77

JL/