

20 NOV. 1978

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial

Se ha inscrito el Registro de acuerdo  
con los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la Memoria adjunta.

ES  
19  
21  
22

NUMERO	468.931
FECHA DE PRESENTACION	19.4.78

A1



ESPAÑA

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 27 18 325.1	25.4.77	Rep. Fed. Al.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C04G/60IN	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	---	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION  
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA GLUCOPROTEINA DE SUERO HUMANO"

71 SOLICITANTE (ES)  
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

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

72 INVENTOR (ES)  
Heinz Haupt y Dr. Siegfried Baudner.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE  
D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 68.280)

POOR QUALITY

1 La invención se refiere a un procedimiento para preparar una nueva glucoproteína a partir de sueros humanos.

5 La nueva glucoproteína se distingue de las proteínas de suero humano, descritas hasta ahora, en sus propiedades físicas e inmunoquímicas.

La glucoproteína, preparada de acuerdo con el procedimiento según el invento se caracteriza por los siguientes parámetros:

10

a) constante de sedimentación en la ultracentrífuga  $3,1 S \pm 0,2$

b) peso molecular de  $49.600 \pm 4.000$ ;

15

c) movilidad electroforética en la zona de las  $\alpha_2$ -globulinas del suero humano;

d) margen isoeléctrico pH 3,8 - 4,1;

e) coeficiente de extinción E 1 cm, 280 mm =  $1\% 7,0 \pm 0,2$ ;

20

f) contenido de aproximadamente  $77 \pm 2 \%$  de  $\alpha$ -aminoácidos con una proporción de  $17 \pm 2 \%$  de leucina y aproximadamente  $22 \%$  de hidratos de carbono

25

g) reacción inmunológica específica con an-

1

ticuerpos dirigidos contra la glucoprotef-  
na.

Para la determinación de los parámetros se uti-  
lizaron los siguientes procedimientos analíticos:

5

Los análisis por ultracentrifugación se realiza-  
ron con una ultracentrífuga de la firma Beckmann, modelo  
E. En el análisis ultracentrífuga se utilizó la proteína  
en 0,2% (peso/volumen) en solución de sal común al 0,9%.  
La sedimentación se efectuó con 60.000 revoluciones por  
10 minuto y a 20°C en una celda de recubrimiento. El regis-  
tro se efectuó utilizando la técnica del explorador de  
ultravioletas a 280 nm. Una determinación del peso molecu-  
lar deducible de ella se efectuó según el método de equi-  
librio según Yphantis.

15

El enfoque isoeléctrico se realizó con ayuda de  
un sistema de aparatos, distribuido por la firma LKB,  
Estocolmo, Suecia y con los reactivos adquiridos de allí.  
Se empleó una columna de 440 ml con sustancias tampón es-  
peciales para ello en el margen de los valores de pH de  
20 3 a 6.

El análisis de hidratos de carbono se realizó  
según Schultze, Schmidtberger, Haupt (1958) Biochem. Z.,  
volumen 329, páginas 490 a 507.

25

El análisis de aminoácidos se efectuó según  
Spackman, Stein y Moore (1958), Anal. Chem. 30, página

280678

1 1190. Se empleó un analizador de aminoácidos Multichrom  
B de la firma Beckmann.

5 Para la determinación inmunológica de la nueva  
glucoproteína se empleó un antisuero, que había sido  
obtenido por inmunización de conejos a lo largo de un pe-  
ríodo de seis semanas con la proteína aislada, empleando  
el coadyuvante completo de Freund. La determinación quan-  
titativa de la proteína con ayuda de este antisuero es  
realizable según el método de Laurell (1966), *Analyt,*  
10 *Biochem.*, volumen 15, páginas 45 a 52. Debido al más lla-  
mativo parámetro de la nueva proteína, a saber a la cons-  
tante de sedimentación relativamente baja de  $3,1 S \pm 0,2$ ,  
al contenido llamativamente elevado de leucina y a la fá-  
cil caracterizabilidad debida a la emigración hasta pH  
15 8,6 en la zona  $\alpha_2$  de las proteínas, la nueva proteína  
es designada como la glucoproteína  $3,1-S-\alpha_2$ , rica en leu-  
cina.

20 En el procedimiento para la preparación de la  
glucoproteína  $3,1-S-\alpha_2$ , rica en leucina se parte de solu-  
ciones que contienen esta proteína, especialmente de sue-  
ro sanguíneo humano, enriqueciéndose la proteína a través  
de varias etapas de procedimiento hasta la purificación.  
Objetivo de los enriquecimientos es en cada caso, o bien  
precipitar la proteína lo más libre posible de componen-  
tes adicionales de suero, o bien precipitar componentes

1 de suero acompañantes y mantener en solución la gluco-  
proteína 3,1-S  $\alpha_2$ , rica en leucina. Objeto de la invención  
es por consiguiente un procedimiento para la preparación  
de glucoproteína 3,1-S  $\alpha_2$ , rica en leucina, en el que en-  
5 cuentra utilización por lo menos una de las siguientes  
etapas de procedimiento hasta la purificación de la pro-  
teína:

a) adición de una sal neutra, empleada usualmente en la  
química de proteínas para el fraccionamiento, hasta la  
10 precipitación de la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leu-  
cina, preferentemente de sulfato de amonio en una canti-  
dad de 2,4 a 2,8 moles/litro con un valor de pH neutro;  
b) mediante adición de un disolvente orgánico, empleado  
usualmente en la química de proteínas para el fracciona-  
15 miento, hasta una concentración, en la que la glucoproteí-  
na 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina, permanece precisamente to-  
davía en solución y se precipitan proteínas acompañantes,  
preferentemente mediante adición de 40% (volumen/volumen)  
de etanol a una solución tamponada en margen de pH débil-  
20 mente ácido a una temperatura de -8 a 0°C, preferentemente  
de -5°C.

Este procedimiento de precipitación de la  
glucoproteína significa que ésta permanece en solución  
con los conocidos procedimientos de fraccionamiento de  
25 plasma con ayuda de etanol según el método VI de Cohn

5 (E. J. Cohn y otros, J. Am. Chem. Soc. 68 (1946), página 459). La porción sobrenadante alcohólica remanente de este procedimiento de precipitación contiene solamente 1 a 26 de todas las proteínas de plasma. Esto indica adicionalmente al experto que el procedimiento de fraccionamiento según Cohn es especialmente adecuado para enriquecer la nueva glucoproteína frente a otras proteínas de plasma.

10 c) Adición de sales, solubles en agua, de bases de acridina, preferentemente el lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina hasta una concentración de 0,01 moles/litro en el margen de pH desde neutro hasta ligeramente alcalino. En este caso no se precipita la nueva glucoproteína 3,1S $\alpha_2$ , mientras que la mayor parte de las proteínas de plasma con excepción de la gamma globulina se precipitan por medio de esta medida.

15 Por consiguiente, una precipitación fraccionada de una solución de proteínas, que junto a glucoproteína 3,1S $\alpha_2$  rica en leucina, contiene además otras proteínas de plasma, con bases de acridina se manifiesta como etapa ventajosa de purificación para la nueva proteína, ya que en este caso se precipita una gran parte de las proteínas acompañantes.

25 d) Adición de ácidos orgánicos empleados en la química de proteínas para la precipitación de proteínas, prefe-

rentemente de ácido tricloroscético hasta una concentración de 0,2 moles/litro, permaneciendo en solución la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  rica en leucina.

5

De esta medida se sabe que es capaz de precipitar la parte de globulina de las proteínas del plasma. Por consiguiente aquélla se manifiesta igualmente como adecuada, para enriquecer la nueva glucoproteína en solución .

10

En lugar de ácido tricloroscético pueden utilizarse también otros ácidos para el enriquecimiento de la nueva glucoproteína, tales como por ejemplo ácido perclórico o ácido sulfosalicílico. Con ácido perclórico, la concentración final empleada usualmente para el fraccionamiento está entre 0,4 y 0,6 moles/litro. Con estas concentraciones la nueva glucoproteína permanece en solución.

15

20

e) Calentamiento de la solución de proteínas que contiene la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina, durante un tiempo corto a una temperatura próxima a 100°C con un valor de pH desde neutro hasta ligeramente ácido. Preferentemente se efectúa la llamada coagulación en caliente de soluciones de proteínas con un valor de pH de aproximadamente 5 durante 5 a 15 minutos a 95 hasta 98°C. En este caso se manifiesta que, después de una operación, permanece en solución la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina.

25

Solo unas pocas proteínas permanecen en solución en las mismas condiciones. La mayor parte de ellas se precipitan con coagulación a partir de la solución.

5 f) Eliminación de electrolitos a partir de la solución que contiene la glucoproteína  $\beta_1$ -S- $\alpha_2$ , rica en leucina. La reducción del contenido de electrolitos de una solución de proteínas conduce a la precipitación de la llamada euglobulina. A esta pertenece una parte de las lipoproteínas, la macroglobulina, una parte de las inmunoglobulinas y ceruloplasmina, para mencionar algunas como ejemplo. Con esta medida designada como la llamada precipitación de euglobulina permanece en solución la glucoproteína  $\beta_1$ -S- $\alpha_2$ , rica en leucina.

10 La reducción de los electrolitos de una solución de proteínas puede realizarse según diferentes procedimientos, por ejemplo con ayuda de la diálisis frente a un medio acuoso con conductividad reducida, eventualmente frente a agua destilada. También son adecuados para esto procedimientos electrodiálisis o la reducción de los electrolitos en solución empleando intercambiadores de iones.

25 g) El fraccionamiento con tamiz molecular de la solución que contiene la nueva glucoproteína con el objeto de enriquecer proteínas con un peso molecular comprendido entre 45.000 y 55.000 o una exclusión de proteínas de peso

1 molecular superior o inferior. Para esto se realiza conve-  
nientemente un fraccionamiento en columna empleando geles  
de tamiz molecular, preferentemente de dextrana transversal-  
mente reticulada con epíclorhidrina. También son adecuados  
5 en el sentido de la invención otros medios de filtración a  
través de gel con límites comparables de exclusión o de frac-  
cionamiento.

h) Tratamiento de la solución de proteínas, que contiene la  
glucoproteína  $\beta_1$ -S- $\alpha_2$  rica en leucina, con un intercam-  
10 biador de aniones, preferentemente uno que contiene amino-  
etilo, dietilaminoetilo o trietilaminoetilo como grupos fun-  
cionales y celulosa como matriz. La glucoproteína  $\beta_1$ -S- $\alpha_2$ ,  
rica en leucina, se fija a tales intercambiadores de iones  
a partir de una solución con concentración de iones de 2 =  
15 0,05. Después de esto, aquélla puede separarse juntamente  
con el intercambiador de iones respecto de las demás pro-  
teínas, que permanecen en solución. La nueva proteína puede  
eluirse mediante aumento de la conductividad de soluciones  
tampón con ayuda de, por ejemplo, sales neutras, tales como  
20 sal común, y de esta manera enriquecerse frente a proteínas  
acompañantes.

i) Electroforesis en medios de soporte adecuados y obten-  
ción de la zona del sector  $\alpha_2$  de las proteínas del plasma.

k) Tratamiento de la solución que contiene la glucoproteína  
25  $\beta_1$ -S- $\alpha_2$ , rica en leucina, con fosfato cálcico hidratado

(MLF)

1 insoluble en agua, preferentemente con hidroxilapatito.  
Incluso con una concentración de iones baja de la solu-  
ción de proteínas, por ejemplo una de 1/1.000 moles/li-  
tro de iones la nueva glucoproteína no se adsorbe en el  
5 fosfato insoluble. En el caso de adecuada purificación  
previa de las soluciones proteínicas que contienen la nue-  
va proteína la porción sobrenadante de adsorción o en el  
procedimiento de cromatografía en la columna la porción  
circulante por la columna constituye la solución de una  
10 glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  purificada.

Utilizada como última de varias de las eta-  
pas mencionadas anteriormente, la porción circulante por  
la columna proporciona la glucoproteína pura.

15 Mediante una combinación cualquiera de las  
etapas de procedimiento, expuestas anteriormente, usuales  
en la química de proteínas, puede enriquecerse a voluntad  
y prepararse de manera pura la nueva glucoproteína 3,1-S-  
-  $\alpha_2$  rica en leucina, a partir de soluciones de proteínas  
que la contienen, tales como por ejemplo suero humano o  
20 una fracción del mismo. La solución finalmente resultante,  
que no contiene más que la glucoproteína 3,1-S-  $\alpha_2$  rica  
en leucina, que contiene todavía eventualmente sales, pue-  
de liberarse de electrolitos y liofilizarse.

25 Un procedimiento preferido para la preparación

de la glucoproteína  $\beta_2$  rica en leucina, parte del conocido fraccionamiento de suero con ayuda de lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina y sulfato de amonio, conocido generalmente con la designación "procedimiento de Rivanol-sulfato de amonio", expuesto en Schultze, Hermanns; Molecular Biology of Human Proteins; Elsevier Publishing Company (1966) página 265. Con estos procedimientos la glucoproteína  $\beta_2$  rica en leucina, se enriquece juntamente con una serie de otras glucoproteínas en una tandra que resulta a partir del suero humano como fracción secundaria en la obtención de albúmina y de globulina gamma. A partir de ello en una primera etapa de separación se precipita una serie de proteínas acompañantes con ayuda de lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina en una concentración de 0,03 a 0,06 moles/litro. El agente precipitante se precipita mediante adición de iones cloruro, preferentemente cloruro de sodio. A la solución de proteínas se añade un intercambiador de iones, que es capaz de fijar la glucoproteína  $\beta_2$  rica en leucina. Se emplea ventajosamente para esto un intercambiador de aniones con grupos funcionales aminoetilo, dietilamino o trietilaminoetilo.

A continuación el intercambiador de iones se trata con una solución tampón de creciente concentración de sal. Por medio de esta medida vuelve a desprenderse la

nueva proteína respecto del intercambiador de iones. La solución se somete a un procedimiento de tamiz molecular, en el que se excluyen proteínas con un peso molecular de 100.000 a 150.000. En la fracción de bajo peso molecular se encuentra la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  rica en leucina, junto a otras glucoproteínas de bajo peso molecular.

Se manifiesta conveniente y útil repetir la cromatografía por intercambio de iones en condiciones algo variantes. Esto puede efectuarse por una parte mediante modificación de las condiciones de adsorción o elución o también mediante la elección de intercambiadores de iones de diferente basicidad. De las impurezas restantes se separa la glucoproteína mediante tratamiento con un adsorbente mineral, por ejemplo hidroxilapatito. En este caso las proteínas compañeras permanecen fijadas en el adsorbente, después de lo cual resulta una solución con glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  pura, rica en leucina.

La glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina, es inmunógena. Su administración por vía parenteral a animales vertebrados, preferentemente a animales habituales de laboratorio, tales como conejos, conduce a la formación de anticuerpos en la sangre de estos animales. Después de esto puede obtenerse su sangre y separarse el suero y enriquecerse eventualmente en lo que se refiere a anticuerpos presentes. Para esto están a disposición del

1 experto métodos habituales de fraccionamiento de las pro-  
teínas del plasma. Mediante inmunización de los animales  
de ensayo con la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  aislada se obtu-  
vo un antisuero, que reacciona de manera estrictamente es-  
5 pecífica con el antígeno de inmunización. No se observa-  
ron reacciones cruzadas con otras proteínas del suero ais-  
ladas hasta ahora.

La nueva glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  rica en leu-  
cina, se manifiesta por consiguiente como agente immuni-  
10 zador valioso en la preparación de antisueros. Estos son  
reactivos diagnósticos valiosos.

Las determinaciones inmunológicas cuantitativas  
de la proteína con ayuda del electro-immunoanálisis se-  
gún Laurell en una mezcla de suero de aproximadamente  
15 1.000 donantes, proporcionaron un contenido medio de glu-  
coproteína 3,1-S- $\alpha_2$  de 2,1 mg/100 ml de suero.

Se comprobó que la concentración de la gluco-  
proteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina, en sueros indivi-  
duales de adultos oscila entre 1,5 y 3,2 mg/100 ml de sue-  
20 ro.

La invención se explica más detalladamente con  
ayuda del ejemplo siguiente.

1 Ejemplo

Material de partida para la preparación de la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$ , rica en leucina, es una fracción que parte de 25 litros de plasma humano. Este es tratado con 0,84% de lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina a pH 8,0. A partir de la porción sobrenadante se precipita el agente precipitante como cloruro, y se elimina, a continuación se precipita a pH 7,0 con 2,0 moles de sulfato de amonio. Este precipitado se separa como fracción rica en gamma globulina y la porción sobrenadante se somete al procedimiento siguiente.

La porción sobrenadante se concentra hasta 5 litros mediante ultrafiltración. El contenido de proteínas de la solución asciende entonces a 3%. La solución se lava en el ultrafiltro con una solución de sal común al 0,85% y después de esto se mezcla con 7,5 g de lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina. El precipitado resultante en este caso se separa mediante centrifugación. A la solución sobrenadante se añade sal común hasta una concentración final de 5% (peso/volumen). En este caso la base de acridina se precipita como cloruro. Este se separa mediante centrifugación. La porción sobrenadante se libera de la sal común mediante lavado sobre el ultrafiltro y se equilibra a pH 7,0 con tampón 0,02 M. de fosfato. Aquella constituye 3 litros de una solución de proteínas

al 2,5 %. A esto se añaden 300 g de intercambiador de iones de dietilaminoetil-celulosa, se agita durante 1 hora, se filtra con succión en el filtro y el residuo del filtro se lava con tampón 0,02 Moles/litro de fosfato, a pH 7,0.

5' Después de esto se lava el intercambiador de iones con una solución de NaCl 1M. La porción circulante se retira en parte. Se continúa tratando una fracción que contiene la glucoproteína, rica en leucina. Se realiza con ésta una filtración a través de gel en SEPHADEX G 150 por medio del cual se realiza la filtración a través de gel en una columna de 20 cm de diámetro y de 1m de altura, la cual está llena con SEPHADEX<sup>(R)</sup> G 150. Como agente eluyen-  
te sirve tampón 0,1 molar de trishidroximetilaminoetano - HCl, de pH 8,0, que contiene 1 mol de NaCl. En este caso se separa una fracción de alto peso molecular y se obtiene una fracción de bajo peso molecular, que contiene la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  rica en leucina.

A continuación se llena con intercambiador de iones de dietilaminoetil-SEPHADEX una columna (aproximadamente 500 ml, 5 x 45 cm), la fracción que contiene la glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  rica en leucina, se aplica sobre la columna y la elución de las sustancias se dispone con un gradiente lineal de sal de desde tampón 0,006 M de trishidroximetilaminometano -HCl con el valor de pH 8,6 sin adición de sal hasta tampón 0,006 M de trishidroxime-

tilaminometano-HCl con el valor de pH 8,6, que contiene 0,2 moles NaCl/litro. El eluato se recoge en fracciones. Se continúan tratando las fracciones que tienen una movilidad eléctrica en zona de  $\alpha_2$  de las proteínas por medio de una electroforé-  
5 sis de control. Para el enriquecimiento de la proteína se mezclan las fracciones con sulfato de amonio hasta una saturación de 70%. El precipitado resultante en este caso se obtiene mediante centrifugación, se disuelve en agua y se dializa frente al mismo tampón,  
10 que se emplea para la siguiente cromatografía QAE.

A continuación se realiza una cromatografía adicional sobre QAE-SEPHADEX en una disposición de ensayo comparable. Para la elución se dispone un gradiente lineal de sal de desde tampón 0,08 molar de acetato de so-  
15 dio de pH 5,5 hasta tampón 0,35 molar de acetato de sodio de pH 5,5. Las fracciones caracterizadas por medio de electroforé-  
sis se obtienen y se continúan tratando.

Primeramente se efectúa una diálisis frente a tampón 0,001 molar de fosfato de sodio de pH 7,0. El  
20 producto equilibrado frente a este tampón se aplica finalmente sobre una columna llena con hidroxilapatito (tamaño de columna 4 x 12 cm). El contenido de la columna se eluye con tampón 0,001 molar de fosfato de pH 7,0. La por-  
ción circulante constituye glucoproteína 3,1-S- $\alpha_2$  pura,  
25 rica en leucina.

Partiendo de 25 litros de plasma humano se obtienen 100 mg de la proteína según la invención.

Esta presenta las siguientes composiciones de amino-ácidos:

	AMINOACIDOS	% en moles de la porción de aminoácido	Coefficiente de Variación %
	Lisina	3,87	5,90
	Histidina	2,23	11,28
5	Arginina	4,65	7,68
	Acido aspártico	11,45	1,49
	Treonina	3,87	6,26
	Serina	6,43	2,36
	Acido glutámico	10,72	2,51
10	Prolina	7,04	4,43
	Glicina	7,32	2,31
	Alanina	6,65	1,97
	1/2 Cistina	1,21	9,83
	Valina	4,48	3,78
15	Metionina	0,75	5,81
	Isolencina	1,29	3,16
	Leucina	22,05	5,79
	Tirosina	0,81	19,53
	Fenilalanina	3,23	1,39
20	Triptófano	1,60	11,69
25			

## HIDRATO DE CARBONO

% en peso

Galáctosa	4,1	$\pm 0,3$
Manosa	3,8	$\pm 0,3$
Glucosa	0	
Fucosa	0,3	$\pm 0,1$
Xilosa	0	
N-acetilhexosamina	8,1	$\pm 0,5$
Acido N-acetilneurámico	6,6	$\pm 0,4$

Suma (porción de hidrato de carbono)	22,9	$\pm 1,6$
--------------------------------------	------	-----------

Las amplitudes de dispersión son límites de error debidos a la metodología.

15

20

25

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 la preparación de una glucoproteína de suero humano, con los parámetros siguientes: a) constante de sedimentación en la ultracentrifuga  $3,1 S \pm 0,2$ ; b) peso molecular de  $49.000 \pm 4.000$ ; c) movilidad electroforética en la zona de las  $\alpha_2$ -globulinas del suero humano; d) margen isoelectrico pH  $3,8 - 4,1$ ; e) coeficiente de extinción  $E \frac{1\%}{1\text{ cm}}$   $280\text{ mm} = 7,0 \pm 2,0$ ; f) contenido de aproximadamente  $77 \pm 2\%$  de  $\alpha$ -aminoácidos con una proporción de  $17 \pm 2\%$  de leucina y  $23 \pm 2\%$  de hidratos de carbono; g) reacción inmunológica específica con anticuerpos dirigidos contra la glucoproteína, caracterizado porque una solución que contiene la proteína se somete por lo menos a una de las medidas siguientes para la purificación de la proteína; a) adición de sales neutras hasta la precipitación de la proteína; b) adición de disolventes orgánicos hasta la precipitación de proteínas acompañantes;

15

20

25

280678

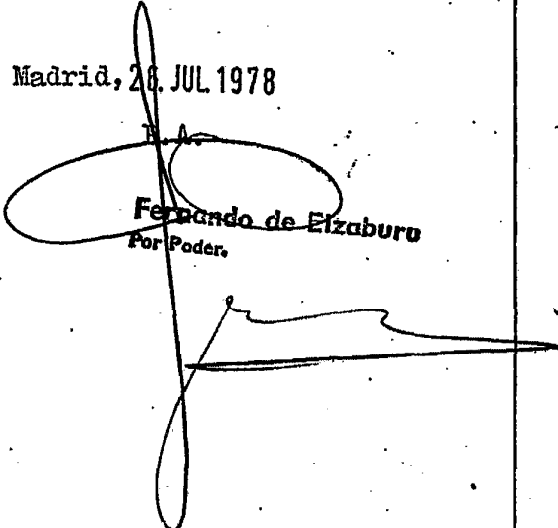
1 c) adición de una sal. soluble en agua, de una base de acri-  
dina hasta la precipitación de proteínas acompañantes; d)  
adición de ácidos orgánicos hasta la precipitación de pro-  
teínas acompañantes; e) calentamiento a una temperatura  
5 comprendida entre 95 y 100°C hasta la precipitación de pro-  
teínas acompañantes; f) reducción del contenido de electro-  
litos hasta la precipitación de proteínas acompañantes; g)  
fraccionamiento con tamiz molecular y obtención de las pro-  
teínas con un peso molecular comprendido entre 45.000 y  
10 55.000; h) adsorción de la proteína en un intercambiador  
de aniones y elución de éste; i) electroforésis y obten-  
ción de la zona  $\alpha_2$  del suero humano; k) adsorción de  
proteínas acompañantes con fosfato de calcio hidratado  
insoluble en agua; después de lo cual se obtiene en cada  
15 caso la fracción que contiene la proteína.

2ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA  
GLUCOPROTEINA DE SUERO HUMANO".

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

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

Madrid, 28. JUL 1978

  
Fernando de Elizaburo  
Por Poder.

25

280678

VAL