

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el R. acuerdo con los datos con la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	469328
FECHA DE PRESENTACION	2-5-78

A1

20 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
P 27 20 704.1	7-5-77	R.F.A.

64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G 7/026 ; A61K 37/02	

67 TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE UNA NUEVA GLUCOPROTEINA"

68 SOLICITANTE (S)

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 77/B 009)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana

69 INVENTOR (ES)

Dr. Hans Bohn y Wilhelm Winckler.

70 TITULAR (ES)

71 REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.282)

MCS/.

POOR QUALITY

1 La invención se refiere a una nueva glucoproteína, que puede detectarse en el suero sanguíneo y en el extracto de placentas humanas y puede aislarse a partir de ellos, así como a un procedimiento para su preparación.

5 La solución de proteínas obtenible mediante la extracción acuosa de placentas humanas contiene, como se sabe, un gran número de componentes que deben asignarse en parte a las proteínas del suero y en otra parte a las proteínas de los tejidos.

10 La invención se ha establecido la misión de aislar una glucoproteína, no conocida todavía hasta ahora, a partir del extracto de placentas humanas, preparar con ésta antisueros dirigidos específicamente contra la nueva glucoproteína, con lo que la glucoproteína pueda ser detectada cualitativamente o determinada cuantitativamente en
15 el suero.

Objeto de la invención es una nueva glucoproteína, que es obtenible a partir del suero sanguíneo y del extracto de placentas humanas. Ella se caracteriza por
20 una proporción de proteínas, que consta esencialmente de α -aminoácidos, de $89 \pm 4\%$, una proporción de hidratos de carbono de $11,1 \pm 2,2\%$, de ellos hexosas $5,3 \pm 1,1\%$, hexosamina N-acetilada $2,8 \pm 0,5\%$, ácido neurámico N-acetilado $2,9 \pm 0,6\%$,
25 un coeficiente de sedimentación S_{20W} de $3,2 \pm 0,3 S$,

1 un peso molecular de 32.000 ± 6.000 ,
un punto isoeléctrico de $\text{pH } 4,3 \pm 0,3$,
un coeficiente de extinción $E_1^{1\%}$ (280 nm) de $13,8 \pm 1,0$,
una movilidad electroforética en la zona comprendida entre
5 albúmina y α_1 -globulinas,
una reacción inmunológica específica con un anticuerpo di-
rigido específicamente contra la proteína y
una actividad proteolítica.

10 La glucoproteína puede designarse como proteína
de trazas en virtud de su concentración normalmente muy re-
ducida en el suero humano.

Para la explicación de los detalles característi-
cos de la glucoproteína se expondrá lo siguiente:

15 La determinación del coeficiente de sedimenta-
ción se realizó en una ultracentrífuga analítica de la fir-
ma Beckman (sistema de aparatos Spinco, modelo E) a 6.000
Rpm en celdas de sector doble con ayuda de la técnica de
explorador de ultravioletas a 280 nm. Como disolvente sir-
vió un tampón 0,05 M de fosfato (pH 6,8) que contenía 0,2
20 moles/litro de NaCl. La concentración de proteínas ascen-
dió a 0,1%. Los coeficientes de sedimentación han sido con-
vertidos por cálculo sobre la base de agua a 20°C.

25 Para la determinación de los pesos moleculares
se utilizó el método de equilibrio de sedimentación y la
electroforesis a través de gel de poliacrilamida. La deter

1 minación en la ultracentrífuga se efectuó a 9.000 Rpm. La
evaluación se efectuó tomando como base un volumen especí-
fico parcial (parcial specific volume) de 0,74 ml/g. En la
ultracentrífuga resultó un peso molecular de $28.100 \pm$
5 2.000.

Para la electroforesis a través de gel de polia-
crilamida se utilizaron dos procedimientos. La separación
en el gel normal de poliacrilamida se efectuó según el mé-
todo de Zwisler y Biel, Z.klin. Chem. 4, página 58,
10 (1966). Para la investigación en el gel que contiene dode-
cilsulfato de sodio se empleó un gel con 7,5% de poliacri-
lamida que contenía 0,1% de dodecilsulfato de sodio. Para
la reducción, las proteínas han sido incubadas en 1% de do-
decilsulfato de sodio con 1% de mercaptoetanol. La colora-
15 ción de las proteínas se efectuó con Negro Amido. A partir
de la emigración en el gel de poliacrilamida que contiene
dodecilsulfato de sodio se dedujo para la glucoproteína un
peso molecular de 35.000 ± 3.000 .

La determinación del punto isoelectrico se reali-
zó con una columna (440 ml) de la firma LKB, Estocolmo. La
llamada mezcla de amfolina tenía en la investigación de la
glucoproteína un margen de pH de 3 a 5.

La investigación de la movilidad electroforética
se efectuó en la micromodificación de instrumentos de Beck
25 man sobre láminas de acetato de celulosa con tampón de

1 dietilbarbiturato de sodio de pH 8,6.

La determinación de los hidratos de carbono se efectuó según el método descrito por H.E. Schultze, R. Schmidtberger, H.Haupt, Biochem. Z. 329, página 490, 5 (1958).

El análisis de aminoácidos se realizó según S. Moore, D.H. Spackmann, W.H. Stein, Anal. Chem. 30, página 1185, (1958), empleando el cromatógrafo de líquido Multichrom B de la firma Beckman. $\frac{1}{2}$ de cistina se determinó como ácido cistéico después de oxidación de las proteínas con ácido perfórmico (S. Moore y otros, Anal. Chem. 30, página 1185, (1958) y subsiguiente cromatografía (S. Moore, J. Biol. Chem. 238, página 235, (1963). El contenido de triptófano ha sido determinado con la determinación fotométrica directa según H. Edelhoch, Biochemistry 6, página 15 1948, (1967).

La caracterización inmunológica de la sustancia se efectúa de la manera más sencilla con un procedimiento de difusión conocido, con el que antígeno, es decir glucoproteína y un anticuerpo dirigido contra la glucoproteína o el antisuero no enriquecido en lo que se refiere a los anticuerpos, se difunden mutuamente en un medio de soporte, tal como por ejemplo agar. Si se reúnen uno con otro los dos componentes de reacción en una proporción favorable, se forma un precipitado visible. 20 25

1 Según este conocimiento, es evidente para el ex-
perto que son posibles todas las técnicas inmunológicas pa-
ra la detección y para la determinación tanto de la nueva
glucoproteína, como también de los anticuerpos dirigidos
5 contra la glucoproteína.

Un método sencillo y por lo general suficientemen-
te exacto para la determinación cuantitativa de la gluco-
proteína en líquidos corporales o en extractos de tejidos
lo constituye la llamada técnica de Laurell. Está descrita
10 en *Analyt. Biochem.* (Nueva York), 15, página 45 (1966).

El efecto proteolítico de la glucoproteína se
comprobó sobre placas de electroforesis de agar con fibri-
na (N. Heimburger, G. Schwick, *Protides of the Biological
Fluids 9th Coll.*, Brügge, página 303 (1961)).

15 Objeto de la invención es además un procedimien-
to para la preparación de la glucoproteína caracterizada
anteriormente, que se caracteriza porque líquidos corpora-
les o extractos de órganos, que contienen la glucoproteína,
se fraccionan tomando como base los siguientes criterios
20 hallados según la invención.

La glucoproteína es precipitable con sales neu-
tras. Con el sulfato de amonio, empleado usualmente para
tales precipitaciones, se precipita la glucoproteína con
una concentración de saturación de la sal de 30 a 60% en
25 un margen de pH en la proximidad del punto neutro.

1 Según su peso molecular, la glucoproteína puede
obtenerse mediante medidas que son adecuadas para la sepa-
ración de sustancias con pesos moleculares comprendidos en
entre 25.000 y 40.000. Se utilizan ventajosamente para esto
5 los métodos de la filtración a través de gel o de la ultra
filtración.

La glucoproteína se adsorbe en intercambiadores
de iones débilmente básicos con un valor de pH neutro o dé-
bilmente alcalino. Se emplea ventajosamente en este caso
10 una solución tampón comparativamente poco concentrada, ya
que mediante aumento de la concentración de sal o también
mediante reducción del valor de pH puede impedirse la ad-
sorción. Por otra parte, con el conocimiento de este com-
portamiento se ofrece la posibilidad de adsorber la gluco-
15 proteína y de eluirla nuevamente empleando soluciones sali-
nas altamente concentradas o soluciones tampón con valor
de pH reducido.

Se ha manifestado que la nueva glucoproteína no
se precipita con las bases orgánicas solubles en agua de
20 la serie de la acridina y de la quinoleína, que encuentran
empleo usualmente para procedimientos de precipitación de
proteínas. En las concentraciones usuales en este procedi-
miento aquélla permanece en la porción sobrenadante acuosa.
Después de esto puede emplearse una base de acridina, tal
25 como lactato de 2-etoxi-6,9-diaminoacridina o una base de

1 - quinoleína, tal como clorhidrato de bis-(2-metil-4-aminoqui-
noleil-6)-carbamida, para la precipitación de proteínas
acompañantes, permaneciendo en la porción sobrenadante la
glucoproteína según la invención.

5 Similares consideraciones pueden valer en caso
de emplearse hidroxilapatito como adsorbente para proteí-
nas. La nueva glucoproteína no manifiesta ninguna afinidad
con el hidroxilapatito, mientras que una serie de proteí-
nas acompañantes es retenida por hidroxilapatito. Este com-
10 portamiento de la glucoproteína es característico, de mane-
ra que el inventor propone designar a la glucoproteína como
una globulina (HPG-1) que pasa al hidroxilapatito.

 En base del conocimiento de la movilidad electro-
forética puede utilizarse la electroforesis preparativa
15 por zonas para el enriquecimiento o aislamiento de la glu-
coproteína.

 La afinidad de la glucoproteína en virtud de su
comportamiento inmunológico puede utilizarse para enrique-
cer la glucoproteína con ayuda de los llamados procedimien-
20 tos de inmuno-adsorción. Para esto puede prepararse de ma-
nera conocida en sí frente a la nueva glucoproteína un in-
munoadsorbente, es decir un anticuerpo fijado al soporte,
que es capaz de fijar específicamente la glucoproteína.
Después de esto la glucoproteína puede volver a eluirse me-
25 diante modificación de las condiciones del medio, tal como

1 ha sido descrito esto múltiples veces en la bibliografía
técnica.

5 Mediante una combinación seleccionada de los métodos
mencionados, que conducen por una parte al enriquecimiento
de la glucoproteína y por la otra a su separación
respecto de las demás proteínas acompañantes, puede efectuarse
el aislamiento de la sustancia según la invención.
En consecuencia, el objeto de la presente invención debe
verse en las etapas individuales de enriquecimiento para
10 la nueva glucoproteína y en los procedimientos para su purificación,
resultantes mediante combinación de las medidas para el enriquecimiento.
La línea directriz para el procedimiento para la preparación de la
glucoproteína consiste en obtener en cada caso la porción que
proporciona una reacción inmunológica positiva con un antisuero
15 dirigido contra la nueva glucoproteína.

Después de realización de las mencionadas etapas de procedimiento
se manifiesta algunas veces que la glucoproteína está impurificada
también por otras proteínas acompañantes comprobables inmunológicamente.
20 Estas son por lo general proteínas de trazas, tal como la nueva
glucoproteína propiamente dicha. En este caso las impurezas se
eliminan mediante su adsorción específica. En este caso se ha
usado de técnicas habituales de la inmuoadsorción, en las que
se utilizan como adsorbentes, según procedimientos
25

1 descritos, anticuerpos, fijados a un soporte, contra la
proteína que se ha de eliminar. Con frecuencia la nueva
glucoproteína, ampliamente pura, está asociada todavía
con trazas de la β_1 -glucoproteína, específica del embara-
5 zo, y/o de la α_1 -B-glucoproteína, designada también como
 α_1 -glucoproteína fácilmente precipitable. Para su separa-
ción pueden emplearse inmunoglobulinas, dirigidas contra
las proteínas, que están fijadas de manera covalente a
preparados de agar reticulados, tales como por ejemplo SE
10 PHAROSE.

La solución de proteínas, aplicada sobre una co-
lumna, que había sido llenada con el inmunoadsorbente es-
pecífico, se desplaza a través de la columna sin fijarse
o combinarse, toda vez que sólo se fijan los componentes
15 contra los que el soporte contiene un asociado inmunológi-
camente activo. La nueva glucoproteína puede liberarse de
esta manera de las impurezas.

Para la preparación de la nueva glucoproteína
se combinan entre sí varias de las medidas citadas y en es-
20 te caso se continúa tratando en cada caso la fracción en
la que puede detectarse inmunológicamente la nueva glucopro-
teína, mientras son desechadas las demás fracciones.

Como material de partida para la preparación de
la nueva glucoproteína puede emplearse cualquiera de los
25 líquidos corporales o de los extractos orgánicos, en que

1 se haga posible detectar inmunológicamente la glucoproteína.
Preferentemente se emplean extractos de placentas humanas,
que pueden obtenerse mediante desmenuzamiento y extracción
5 con agua o con una solución salina diluida, convenientemen-
te con una concentración menor de 10%, ventajosamente con
una solución salina neutra al 0,5%, tal como por ejemplo
cloruro de sodio. Convenientemente se emplea por 1 kg de
placentas aproximadamente 1 a 5 litros de solución de ex-
tracción. Las porciones no disueltas se separan respecto
10 del extracto mediante centrifugación o filtración.

El procedimiento para el enriquecimiento está ca-
racterizado por la aplicación de por lo menos una de las si-
guientes medidas a líquidos corporales, que contienen la
nueva glucoproteína y la subsiguiente obtención de la frac-
15 ción enriquecida en lo que se refiere a la glucoproteína:

a) Adición de derivados, solubles en agua, de una base de
acridina o de quinoleína, preferentemente del lactato de
2-etoxi-6,9-diaminoacridina en el margen de pH de 5 a 10,
preferentemente a aproximadamente pH 8, hasta una concen-
20 tración final de aproximadamente 0,8% (peso a volumen),
permaneciendo esencialmente en la porción sobrenadante
la glucoproteína.

b) Adición de sales neutras hasta la precipitación de la glu-
coproteína preferentemente de sulfato de amonio con valor
25 de pH aproximadamente neutro de 5 a 8 hasta 30 a 60% de

- 1 la concentración de saturación del sulfato de amonio.
- 5 c) Adsorción de la glucoproteína en un intercambiador de iones, débilmente básico, tal como dietilaminoetilcelulosa, con una conductividad de la solución de 0 a 2 mS y valor de pH neutro o débilmente alcalino (6 a 9), por ejemplo empleando un tampón aproximadamente 0,01 M con el valor de pH de aproximadamente 8. Un tampón que se ha de emplear preferentemente es por ejemplo tris-hidroximetilaminometano-HCl. La elución de la glucoproteína puede conseguirse disminuyendo el valor de pH por debajo de pH 7,0 o aumentando la conductividad por encima de 5 mS.
- 10 d) Separación en virtud de tamaño molecular (fraccionamiento con tamiz molecular). Es especialmente adecuada la filtración a través de gel en una columna, llena con un polímero de tamaño de poros correspondiente, por ejemplo dextrana reticulada con epíclorhidrina, tal como SEPHA-DEX^(R) preparado por la firma Pharmacia, Uppsala, con el objeto de enriquecer proteínas con un peso molecular de aproximadamente 50.000. No obstante, pueden utilizarse también productos, tales como ULTROGEL^(R) de LKB, Bromma o BIO-GEL P^(R) de Bio-Rad-Laboratories, Richmond, California.
- 15 e) Realización de una adsorción con hidroxilapatito. Dado que la glucoproteína en solución tampón de fosfato diluida no es fijada por hidroxilapatito, el hidroxilapatito es un agente adecuado para eliminar de la solución pro-
- 20
- 25

1 teínas acompañantes de la glucoproteína. La solución de proteínas se ajusta para esto convenientemente a un valor de pH en torno al punto neutro y la conductividad de la solución se mantiene en aproximadamente 1 mS.

5 f) Electroforesis preparativa por zonas.

Es adecuada para la realización de una electroforesis una solución, que contiene la glucoproteína, preferentemente una solución tampón alcalina, por ejemplo en un tampón de dietilbarbiturato de sodio de pH 8,6 y con una concentración de iones de 0,1. La solución se incorpora en un sistema de aparatos para la electroforesis preparativa, tal como se describe por ejemplo por N. Heimbürger y R. Schmidtberger en Behringswerke-Mitteilungen, cuaderno 43, páginas 83 y siguientes, especialmente en las páginas 119 - 120. En el caso del aparato se trata de la disposición horizontal de una electroforesis en soporte en una cuba abierta, en la que el material de soporte se enfría a por debajo de 10°C para la evacuación del calor de Joule resultante durante la electroforesis. Como material de soporte sirven sustancias indiferentes frente a proteínas, ventajosamente poli(cloruro de vinilo), o sus copolímeros en forma de un granulado fino.

Es recomendable efectuar la electroforesis en el margen de pH alcalino, ventajosamente a aproximadamente pH de 8,6, con una concentración de iones de 0,08 a 0,12 y con

1 una intensidad de campo de 4 a 6 voltios/centímetro. Cuando
se utiliza tampón de dietilbarbiturato de sodio 0,1 M, con
el valor de pH 8,6, la glucoproteína emigra en el campo
eléctrico a la zona de las proteínas del plasma que está en
5 tre albúmina y α_1 -globulinas.

Para la obtención de la nueva glucoproteína se re-
corta y retira la zona correspondiente y a partir del mate-
rial de soporte inerte se eluye con ayuda de agua o de solu-
ciones salinas acuosas, por ejemplo de una solución de sal
10 común al 0,5 hasta 1%.

La proteína preparada según la invención tiene
propiedades antigénicas. Una inmunización de animales realiza-
da con ella según métodos conocidos conduce a la formación
de anticuerpos específicos en la sangre de los animales in-
15 munizados. Sus sueros pueden obtenerse según procedimientos
usuales y los anticuerpos contenidos en ellos pueden enri-
quecerse. Los antisueros pueden hallar empleo en procedi-
mientos inmunológicos conocidos para la detección y para la
determinación de la nueva proteína en líquidos corporales,
20 especialmente en el suero sanguíneo. Además de esto la glu-
coproteína manifiesta propiedades proteolíticas y fibrinolí-
ticas. Se detectó igualmente un efecto disgregador de pla-
quetas. Por consiguiente la glucoproteína según la invención
tiene propiedades medicamentosas valiosas.

25 En el ejemplo siguiente se explica más detallada-

1 mente la invención:

Ejemplo:

5 Se desmenuzan 150 kg de placentas congeladas a muy bajas temperaturas y se extraen con 150 litros de una solución acuosa al 0,5% de cloruro de sodio. El extracto se
ajusta a pH 8 con hidróxido de sodio 2n y se mezcla con 50 litros de una solución acuosa al 3% de lactato de diamino-
etoxiacridina. Después de un tiempo de espera de 1 hora, se
10 sifona la porción sobrenadante que contiene la glucoproteína (HPG-1) según la invención, se mezcla con 5% de cloruro de sodio sólido (11 kg) para la separación del lactato de diaminoetoxiacridina que ha quedado todavía en solución, se filtra y se mezcla con 30% -referido al peso del líquido- de sulfato de amonio sólido y se agita bien a fondo. Después de 1 hora se separa por filtración el precipitado.

15 500 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 de valor de pH 7,0, que contiene 0,05% de azida de sodio. La solución dializada se cen-
20 trifuga y la porción sobrenadante se completa con la misma solución tampón hasta 2.000 ml, se ajusta a pH 8,0 con solución de hidróxido de sodio 0,1 n y se mezcla agitando durante 1 hora con 500 g de dietilaminoetilcelulosa húmeda (fir-
25 ma Serva, Heidelberg).

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

10 A los eluatos reunidos se añade 30% de sulfato de
amonio, referido al peso del líquido, y se mezcla agitando
el conjunto. El precipitado, que contiene la glucoproteína
(HPG-1), se disuelve en 300 ml de agua destilada. La solu-
ción de proteínas se dializa frente a tampón de tris-hidro-
ximetil-aminometano-ácido clorhídrico de pH 8,0, que contie-
15 ne 1,0 moles de cloruro de sodio/litro y se aplica sobre
una columna (100 x 20 cm) llena con Sephadex G-150 y se elu-
ye con el tampón mencionado. Durante la elución tiene lugar
un fraccionamiento de las proteínas según su tamaño molecu-
lar.

20 A continuación se ensayan los eluatos con antisue-
ro específico, se recogen las fracciones que contienen la
glucoproteína (HPG-1) y a partir de ellas se precipitan nue-
vamente las proteínas, tal como está descrito anteriormen-
te, con 30% de sulfato de amonio sólido.

25 Para la purificación ulterior, el precipitado se

1 disuelve en 50 ml de agua, se dializa frente a un tampón de
fosfato 0,005 M, pH 6,8, y se vierte sobre una columna de
3 x 23 cm, llena con hidroxilapatito. El revelado de la co-
luna se efectúa con el tampón de fosfato 0,005 M, pH 6,8.
5 La glucoproteína (HPG-1) aparece en la fracción que ha pasa-
do; ésta se concentra sobre un ultrafiltro. El concentrado
se dializa a continuación frente a un tampón de tris-(hidro-
ximetil)-aminometano-HCl 0,01 M, pH 7,0, y se adsorbe en
DEAE-SEPHADEX (columna de 3 x 23 cm). Para la elución y se-
10 paración de las proteínas adsorbidas sirve un gradiente de
NaCl de 0 a 2%. Las fracciones de eluato que contienen la
glucoproteína (HPG-1) se recogen, se concentran, se diali-
zan frente a agua y a continuación se liofilizan. Se obtie-
nen aproximadamente 20 mg de la nueva glucoproteína en una
15 pureza de >99%.

Esta presenta las siguientes composiciones de
aminoácidos (frecuencia con coeficiente de variación en %):

20

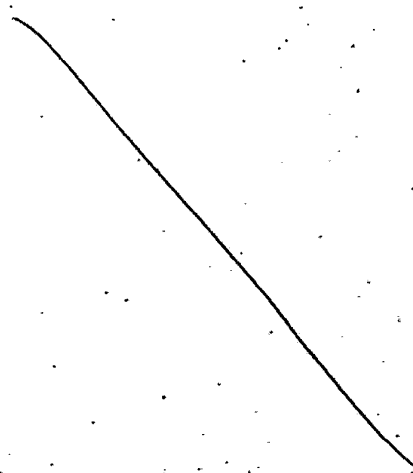
25

28028

	<u>Frecuencia en % en moles</u>	<u>Coefficiente de variación %</u>	
1	Lisina	0,67	39,25
	Histidina	3,36	9,97
	Arginina	5,09	6,58
5	Acido aspártico	5,87	3,07
	Treonina	3,83	15,74
	Serina	7,84	8,22
	Acido glutámico	11,76	1,35
	Prolina	6,46	1,71
10	Glicina	10,24	4,49
	Alanina	11,25	3,76
	Cistina/2	5,10	6,34
	Valina	6,87	5,18
	Metionina	0,42	14,48
15	Isoleucina	2,47	5,07
	Leucina	11,42	4,23
	Tirosina	2,95	5,45
	Fenilalanina	2,42	13,52
20	Triptófano	1,98	11,37

25

28028



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

15

20

25

21078

1ª.- Procedimiento para el enriquecimiento de una nueva glucoproteína con a) una proporción de proteínas de $89 \pm 4\%$; b) una proporción de hidratos de carbono de $11,1 \pm 2,2\%$; de ellos hexosas $5,3 \pm 1,1\%$, hexosamina N-acetilada $2,8 \pm 0,5\%$, ácido neurámico N-acetilado $2,9 \pm 0,6\%$; c) un coeficiente de sedimentación S_{20w} de $3,2 \pm 0,3S$; d) un peso molecular de 32.000 ± 6.000 ; e) un punto isoeléctrico de $pH 4,3 \pm 0,3$; f) un coeficiente de extinción $E_1^{1\%}$ (280 nm) de $13,8 \pm 1,0$; g) una movilidad electroforética en la zona comprendida entre albúmina y α_1 -globulinas; h) una reacción inmunológica específica con un anticuerpo dirigido específicamente contra la glucoproteína; i) una actividad proteolítica, que se caracteriza porque una solución de proteínas, en la que puede detectarse inmunológicamente la glucoproteína, se somete por lo menos a una de las medidas siguientes, y se obtiene la fracción enriquecida en lo que se refiere a la glucoproteína: a) adición de sales neutras hasta la precipitación de la glucoproteína; b) fraccionamiento

1 con tamiz molecular y obtención de la fracción con un peso
molecular de 25.000 a 40.000; c) adsorción de la glucoproteína en un intercambiador de iones ligeramente básico y
5 elución de éste; d) adición de derivados, solubles en agua,
de una base de acridina o de quinoleína en el margen de pH
de 5 a 10 hasta una concentración final de aproximadamente
0,8%; e) tratamiento de la solución de glucoproteína con hi
droxilapatito; f) electroforesis preparativa por zonas y ob
tención de la zona comprendida entre albúmina y α_1 -globuli
10 nas; g) tratamiento de la solución de glucoproteína con un
inmunoadsorbente.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª,
que se caracteriza porque como solución de glucoproteínas
se emplea un extracto procedente de placentas humanas.


15 3ª.- Procedimiento para el enriquecimiento de una
nueva glucoproteína.

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, 31.JUL.1978

P.A.


Fernando de Elizaburu
Por Poder.

25

21078

F C M