



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 110**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C07B 63/00 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

C07K 14/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04722118 .9**

96 Fecha de presentación : **19.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1606232**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Proceso de extracción mejorado.**

30 Prioridad: **21.03.2003 NZ 524868**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

73 Titular/es: **VELVET ANTLER RESEARCH NEW
ZEALAND LIMITED**
**Agresearch New Zealand Limited, Puddle Alley
Mosgiel, NZ**

72 Inventor/es: **Haines, Stephen**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 358 110 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso de extracción mejorado.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un proceso de extracción mejorado. En particular, la presente invención se refiere a un proceso de extracción mejorado para aislar péptidos de bajo peso molecular a partir de tejido animal.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 En los mercados de alimentos saludables y biomédicos existe una demanda creciente para extractos de productos animales que contienen niveles enriquecidos de factores de crecimiento y otros polipéptidos de bajo peso molecular. Esta demanda se deriva de la bioactividad intensificada, y solubilidad y estabilidad a menudo mayor, de polipéptidos más pequeños en relación a las proteínas más grandes presentes en el tejido u otra fuente de material. En particular, péptidos de bajo peso molecular y extractos del factor de crecimiento tienen propiedades que los hacen adecuados para un número de diversas aplicaciones que incluyen productos médicos (por ejemplo, cicatrización de herida), ingredientes en suplementos dietéticos, cosméticos y medios de crecimiento celular.

15 Se han desarrollado y usado una variedad de métodos estándares para extracción acuosa de tejidos animales ampliamente para aislar proteínas, Scopes R.K. (1987). Típicamente, la extracción acuosa involucra usar algún método para romper células, tal como ruptura por ultrasonido o mecánica (en una mezcladora), en la presencia de agua o una sal acuosa o amortiguador. El pH del sistema de extracción es algunas veces manipulado, o se usan detergentes y otros aditivos, para intensificar la solubilidad de proteínas objetivo específicas (por ejemplo, enzimas asociadas con la membrana). Sin embargo, típicamente el extracto de proteína total inicial contendrá proteína que tiene un intervalo
20 amplio de pesos moleculares. Etapas de procesamiento adicionales son entonces requeridas para enriquecimiento selectivo de factores de crecimiento y otros polipéptidos de bajo peso molecular en los extractos de proteína total.

25 La producción comercial de extractos de tejido enriquecido con el factor de crecimiento enriquecidos con péptidos de bajo peso molecular requiere de métodos efectivos en costos, prácticos para remover proteínas de alto peso molecular no deseadas a partir de las mezclas. Los métodos actuales que son aplicables en una escala industrial para fraccionamiento de extractos de tejido y otro material derivado de animal (por ejemplo, sangre, leche, calostro), con enriquecimiento potencial de factores de crecimiento, incluyen:

- Ultrafiltración
- Cromatografía de filtración por gel (GFC)(también conocida como cromatografía de exclusión por tamaño)
- Otros sistemas de fraccionamiento cromatográfico (por ejemplo, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad)
- División de fase líquida en sistemas multifásicos
- Precipitación de solución acuosa (es decir, de la fase líquida) usando solventes orgánicos miscibles en agua (etanol, acetona), típicamente el solvente orgánico es enfriado en hielo algunas veces con la adición de solventes orgánicos inmiscibles (cloroformo) para intensificar el efecto de desnaturalización, Scopes, R.K. (1987).
- 35 • Salazón con sales neutras o aminoácidos

Sin embargo, en muchos casos estos métodos se han usado para aislar enzimas y otras proteínas moderadamente grandes, en lugar de la concentración de factores de crecimiento y otros péptidos. Por ejemplo, la precipitación usando etanol frío es la base del método de fraccionamiento Cohn tradicional para la preparación de albúmina y otras proteínas a partir de plasma.

40 Consecuentemente, estos métodos tienen las desventajas, o de otra forman no son apropiados, para enriquecimiento general de factores de crecimiento y otros polipéptidos de bajo peso molecular.

45 La ultrafiltración y GFC ambos requieren inversión de capital costoso, son sensibles a incrustación y este último resulta en dilución de la fracción de bajo peso molecular deseado. Otros sistemas de fraccionamiento cromatográfico pueden también ser costosos para operar, y tienden a ser usados para purificar péptidos específicos en lugar de aislar fracciones de alto o bajo peso molecular.

50 La división de fase líquida en sistemas de multifase (por ejemplo, extracción de punto de turbidez y sistemas acuosos de dos fases) es particularmente de uso cuando una proteína lábil (por ejemplo, una enzima) es el producto deseado ya que la proteína es retenida a través de todo el ambiente acuoso, Skopes R. K. (1987), Tani H. et al (1997). Esto ayuda con la retención de la actividad biológica de la molécula. La desventaja del método es que el producto deseado se obtiene en la presencia de grandes cantidades de detergentes, sales y/o polímeros solubles en agua los cuales pueden ser removidos. Esto se agrega al costo del proceso y frecuentemente necesita el uso de etapas adicionales tales como ultrafiltración.

Los otros métodos restantes también resultan en adición de grandes cantidades de otros químicos (solvente orgánico, aminoácidos o sales) los cuales pueden ser removidos a partir de la solución de polipéptido. Así como incrementar los costos debido a la necesidad de etapas de procesamiento adicionales, estas pueden introducir cuestiones de seguridad como en el caso del uso de grandes volúmenes de solventes inflamables y/o tóxicos. La manipulación segura y eventual eliminación de los solventes requiere el uso de instalaciones y equipamiento para procesamientos especialmente diseñados y típicamente muy costosos.

El documento US 6,093,402 describe extracto de citrus amanatsudaidai para aislar un péptido. El documento EP0273121 describe oligopéptidos extraídos de sangre de bovino a un método para su preparación y empleo. El documento WO97/00269 describe una familia de péptidos antimicrobianos lineales a partir del intestino de Mixina. El documento WO97/00269 también describe las secuencias químicas de estas proteínas.

Se reconoce que el término "comprende" puede, bajo jurisdicciones variadas, ser atribuido ya sea con un significado exclusivo o uno inclusivo. Para el propósito de esta especificación, y a menos que se note de otra forma, el término "comprende" debe tener un significado inclusivo, es decir, que debe ser tomado en el sentido de una inclusión de no solamente los componentes listados directamente en las referencias, sino también otros componentes o elementos no especificados. Este razonamiento también puede ser usado cuando el término "comprendido" o "que comprende" se usan en relación a una o más etapas en un método o proceso.

Es un objetivo de la presente invención hacer frente a los problemas precedentes o al menos proporcionar al público una opción útil.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención pueden llegar a ser aparentes de la descripción consiguiente la cual se proporciona por medio de ejemplo únicamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCÓN

Las deficiencias de estos métodos variados para remover proteínas más grandes de extractos de tejido, cuando los péptidos de bajo peso molecular son los péptidos de interés, lleva a los inventores a considerar una nueva alternativa. Es decir, la prevención de la disolución inicial de proteínas de fracción de alto peso molecular, por desnaturalización *in situ* dentro del tejido, por un solvente orgánico (preferiblemente etanol) antes de la extracción acuosa. El tratamiento de tejido sólido con solvente orgánico se ha usado previamente, pero específicamente para la deslipidación y deshidratación del tejido (Scopes, R.K. (1987), Betzing, H. et al (1975)) en lugar de intensificar la concentración de polipéptidos de bajo peso molecular en extractos acuosos subsecuentes. Consecuentemente, se requiere aislamiento adicional de los péptidos de LWM.

De conformidad con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para aislar péptidos de bajo peso molecular ("LWM") de tejido *in situ*, que comprende las etapas de:

a) homogenizar el tejido;

b) mezclar el tejido homogenizado con un solvente orgánico para formar una suspensión completamente humedecida;

c) dejar reposar o agitar la suspensión para desnaturalizar las proteínas *in situ* dentro del tejido;

d) remover el solvente orgánico del tejido;

e) mezclar el tejido tratado con solvente orgánico de la etapa d) con un volumen suficiente de agua o una solución acuosa para extraer los péptidos;

f) separar un extracto líquido del residuo del tejido de la etapa e) para obtener una solución acuosa que contiene la fracción del péptido de bajo peso molecular removido del tejido.

El término "aislado" significa sustancialmente separar, o purificar lejos de, péptidos de alto peso molecular u otro material no deseado dentro del tejido del cual se extraen péptidos de bajo peso molecular.

A través de esta especificación, el término "péptido de bajo peso molecular" o "péptido de LWM" se refiere a un péptido que tiene un peso molecular aparente de 10,000 Daltons o menor.

A través de esta especificación, el término "peso molecular aparente" como se usa en la presente se refiere al peso molecular de un péptido determinado por cromatografía de filtración en gel.

A través de esta especificación, el término "extracto de proteína total" como se usa en la presente, se refiere a un extracto de tejido preparado usando técnicas de extracción acuosas de la técnica anterior estándar, tales como las detalladas anteriormente en la discusión de la técnica antecedente, sin algún intento para controlar los pesos moleculares de las proteínas contenidas en el extracto.

A través de esta especificación, el término "agitación" o variaciones gramáticas de este término se refieren al proceso de agitación, sacudimiento o irradiación con ultrasonido para lograr un efecto de mezclado.

- El tejido puede ser cualquier tejido animal, o producto animal sustancialmente sólido (que incluye sangre seca, leche o calostro) del cual se desea extraer péptidos de LWM.
- En general, el tejido puede ser homogenizado vía ultrasonido o rompimiento mecánico de forma que sea finamente dividido. Por ejemplo, el tejido puede ser homogenizado vía un mortero y mano de mortero, mezclador, molino o cualquier otro equipo adecuado.
- En general, antes de la homogenización, el tejido puede ser primero opcionalmente sometido a una pre-etapa de secado para ayudar con la homogenización o con la preservación del tejido.
- El tejido se puede secar por cualquier proceso el cual es capaz de remover agua de este, sin afectar las propiedades de los péptidos de LWM de interés dentro del tejido.
- En modalidades preferidas, el tejido puede ser liofilizado de forma que no afecte alguno de los factores de crecimiento sensibles al calor.
- El solvente orgánico puede ser cualquier solvente orgánico el cual no afecta las propiedades de los péptidos de LWM de interés.
- En algunas modalidades, el solvente orgánico puede ser acetona, acetonitrilo, metanol, propan-1-ol, propan-2-ol.
- En modalidades preferidas, el solvente orgánico puede ser etanol debido a su actividad anti-microbiana y baja toxicidad. Más preferiblemente, en el caso de tejido seco se puede usar etanol al 70%.
- En modalidades, en donde se usa el proceso de extracción de la presente invención con relación al tejido fresco, se puede agregar suficiente etanol absoluto para proporcionar un contenido de agua total de aproximadamente 30% con respecto al volumen de etanol. Opcionalmente, una vez que se ha logrado el contenido de agua, se puede agregar etanol al 70% adicional, si se requiere, para crear una suspensión libre completamente humedecida.
- Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que mientras las concentraciones elevadas o bajas de etanol pueden ser opcionalmente usadas: la actividad anti-microbiana máxima de etanol ocurre en la concentración preferida de etanol al 70%.
- Para fácil referencia, solamente el solvente orgánico puede ahora ser simplemente referenciado como etanol.
- A través de esta especificación, el término “completamente humedecido” se refiere a la adición suficiente de líquido a un sólido finamente dividido de forma que produzca una suspensión de flujo libre.
- El término “fase líquida” como se usa en la presente, se refiere al uso de soluciones de materiales que son normalmente sólidas (por ejemplo, proteínas), de forma que las operaciones de procesamiento son realizadas completamente con líquidos.
- A través de esta especificación, el término “temperatura ambiente” debe significar la temperatura del ambiente comprendido y debe sustancialmente estar en el intervalo de 10-30°C.
- En general, la suspensión completamente humedecida puede ser dejada en reposo o ser agitada por un periodo de al menos sustancialmente una hora a una temperatura ambiente. Más preferiblemente, la suspensión completamente humedecida se deja en reposo o es agitada por al menos sustancialmente tres horas o más, y a una temperatura ambiente. Sin embargo, el desempeño de esta etapa a una temperatura inferior (es decir, por debajo de la temperatura ambiente), si es necesario mantener actividad biológica de los péptidos de LWM, no se excluye por este método. En modalidades preferidas, la agitación es la preferida sobre simplemente permitir reposar la suspensión, como se puede esperar razonablemente por aquellos expertos en la técnica para dar lugar a la extracción más eficiente de componentes solubles del tejido.
- Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el periodo en el cual se deja reposar la suspensión completamente humedecida, debe ser suficiente para permitir la desnaturalización de las proteínas a ocurrir *in situ* dentro del tejido. Así como también para reducir la carga microbiológica de la suspensión. Después que la suspensión completamente humedecida se ha dejado reposar, el etanol se puede remover en una variedad de diferentes maneras.
- En algunas modalidades, el etanol se puede remover por filtración, centrifugación u otros medios físicos. Sin embargo, se debe apreciar que al remover etanol de esta manera puede resultar en un rendimiento bajo de péptidos de LWM en la solución acuosa final. Puede ocurrir algo de disolución de péptidos hidrofóbicos o de LWM en el solvente orgánico.
- De esta forma, en modalidades preferidas el etanol puede ser removido vía evaporación directa del solvente orgánico bajo vacío. Más preferiblemente, la evaporación se puede lograr usando solamente calor suave, de forma que la temperatura permanezca por debajo de sustancialmente 30°C, en donde es un objetivo la preservación de los factores de crecimiento sensibles al calor.
- Una vez que el etanol se ha removido, el tejido tratado con etanol puede ser completamente secado bajo alto vacío, por

ejemplo en un liofilizador o similar. Esta etapa opcional es recomendada en donde se desea remover restos del solvente orgánico para facilitar el almacenaje del tejido en esta etapa, o reducir las posibilidades de que los restos del solvente orgánico afecten el rendimiento o composición de los péptidos de LWM obtenidos en la extracción a base de agua final de las etapas del método restante f) o etapa del método g) esta última etapa siendo detallada posteriormente.

- 5 El término “solución acuosa” como se usa en la presente, se refiere a una solución en la cual el solvente usado es agua e incluye sal acuosa o soluciones amortiguadoras.

En algunas modalidades preferidas, puede existir una etapa adicional d1) en donde el tejido tratado con el solvente de la etapa d) puede ser completamente secado antes de la etapa abordada e).

- 10 El tejido tratado con etanol de las etapas d) o d1) puede ser mezclado con agua o con sal acuosa adecuada o solución amortiguadora (que incluye, amortiguador de fosfato, amortiguador de citrato, amortiguador de acetato, amortiguador tris o solución diluida de cloruro de sodio). La mezcla resultante debe ser preferiblemente agitada por sustancialmente una hora. Para preservación de los factores de crecimiento, esto nuevamente debe ser realizado a baja temperatura, es decir, temperatura ambiente o inferior.

- 15 Se prevé que un extracto líquido se puede separar del tejido tratado de etanol en la etapa e) de diferentes maneras. Por ejemplo, el extracto líquido puede separarse (es decir, aislar del residuo sólido) por

- o decantación;
- o centrifugación;
- o filtración; u
- o otros procesos adecuados como será aparente para una persona experta en la técnica.

- 20 Más preferiblemente, el extracto líquido se puede clarificar por centrifugación, filtración fina o cualquier otro proceso de clarificación adecuado.

En algunas modalidades preferidas, puede existir una etapa adicional g) en donde las etapas e) a f) se pueden repetir, una o más veces, para mejorar el rendimiento del extracto líquido a partir del residuo del tejido de la etapa e).

- 25 Una vez que las soluciones de péptidos de bajo peso molecular se han obtenido de las etapas f) o g) el extracto líquido puede ser opcionalmente secado para propósitos de almacenaje o procesamiento adicional (por ejemplo, formulación del producto).

En modalidades preferidas, el extracto líquido de las etapas f) o g) puede ser secado para obtener péptidos de bajo peso molecular.

- 30 Más preferiblemente, el secado de las soluciones de péptidos de bajo peso molecular de las etapas f) o g) se puede lograr vía liofilización, a pesar que son posibles otros medios de secado dependiendo de las propiedades de los péptidos de bajo peso molecular de interés.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una mezcla aislada de péptidos de bajo peso molecular obtenidos por el proceso.

- 35 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un solvente orgánico para desnaturalizar proteínas *in situ* dentro del tejido como parte de un proceso de extracción para aislar péptidos de bajo peso molecular a partir del tejido.

De esta forma, modalidades preferidas del proceso de extracción de LWM *in situ* de la presente invención pueden tener un número de ventajas sobre el proceso de extracción de la técnica anterior las cuales pueden incluir:

- 40
1. Proporcionar un método simple para obtener un extracto de péptido de LWM aislado con una concentración elevada de péptidos de LWM, que se logra usando los métodos actuales de extracción.
 2. Proporcionar un método el cual específicamente se dirige al aislamiento de péptidos de LWM.
 3. Proporcionar un método el cual minimiza el uso de grandes cantidades de reactivos costosos o peligrosos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 45 Aspectos adicionales de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción la cual se proporciona por medio de ejemplo únicamente y con referencia a las figuras acompañantes en las cuales:

La Figura 1(a) Muestra un perfil de cromatografía de filtración con gel del extracto de proteína total de ciervo de terciopelo;

- La Figura 1(b) Muestra un extracto de LWM de ciervo de terciopelo preparado usando el nuevo proceso de extracción *in situ* de la presente invención y se proporciona una escala de peso molecular aproximado debajo de cada cromatograma;
- La Figura 2 Un extracto de LWM preparado por precipitación de proteínas de alto peso molecular de extracto de proteína total de ciervo de terciopelo por adición de etanol frío en la fase líquida;
- 5 La Figura 3 Muestra perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación (la cual se realiza durante 3 horas);
- La Figura 4 Muestra una gráfica que muestra las relaciones de proteínas de LWM y HMW en extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación (la cual se realiza durante 3 horas);
- 10 La Figura 5 Muestra perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación (la cual se realiza durante 16.5 horas);
- La Figura 6 Muestra una gráfica que muestra las relaciones de proteínas de LWM y HMW en extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con periodos variados de incubación con etanol al 70% en la etapa de pre-tratamiento de incubación;
- 15 La Figura 7 Muestra una gráfica que muestra la relación de proteínas de LWM y HMW en extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparadas usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con relaciones variadas de etanol al 70% al tejido de ciervo de terciopelo en la etapa de pre-tratamiento de incubación;
- 20 La Figura 8 Muestra perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con solventes orgánicos variados en la etapa de pre-tratamiento de incubación;
- La Figura 9 Muestra perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de ciervo de terciopelo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con amortiguadores usados para la etapa de extracción acuosa;
- 25 La Figura 10 Muestra perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de placenta de ciervo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación;
- La Figura 11 Muestra los perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de sangre de ciervo preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación;
- 30 La Figura 12 Muestra los perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM de hígado de oveja preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con concentraciones variadas de etanol en la etapa de pre-tratamiento de incubación; y
- La Figura 13 Muestra los perfiles de cromatografía de filtración con gel de extractos de LWM del hígado de oveja preparados usando el nuevo proceso de extracción *in situ*, y con amortiguadores variados usados para la etapa de extracción acuosa;
- 35 La Figura 14 Muestra un perfil de cromatografía de filtración con gel de un extracto de LWM preparado de tejido de ciervo de terciopelo congelado usando el nuevo proceso de extracción *in situ* comparado con un extracto similar preparado a partir de tejido de ciervo de terciopelo liofilizado.
- 40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

EXPERIMENTAL

Proceso de Extracción de LWM *in situ* de Ciervo de Terciopelo Secado con Calor y Liofilizado

- Polvo de ciervo de terciopelo molido (5.00 g) derivado a partir de la porción molida de un cuerno tradicionalmente secado (calor) se pesó en un matraz de evaporación Buchi de 500 ml. Se agregó suficiente etanol al 70% (~30 ml) para crear una suspensión móvil y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (20°C) con un agitador magnético durante una hora. El solvente después se removió en evaporador rotatorio usando un Rotoevaporador Buchi con un baño de agua al 30°C. Los restos del solvente residual se removieron bajo alto vacío por uso de una bomba de aceite (Edwards) durante una hora. Se agregó agua desionizada (100 ml) al residuo seco y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (20°C) en un agitador magnético durante tres horas. Después de la filtración a través de papel filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A) lo filtrado se centrifugó a 14,600 g durante 30 minutos a 4°C. Lo sobrenadante se decantó en una botella de vidrio y después se cubrió por congelamiento y se liofilizó en un liofilizador de gabinete (Cuddon) para proporcionar el Extracto
- 45
- 50

de LWM de Ciervo de Terciopelo (0.297 g, 5.9% de rendimiento) como un sólido “pegajoso” ligeramente marrón. El contenido IGF-1 del extracto de LWM obtenido se midió a 0.32 µg/g, Tabla 1 de referencia.

El proceso de extracción se repitió con un polvo de ciervo de terciopelo molido compuesto (5.00 g) derivado de la cornamenta liofilizada. El extracto de LWM (0.312 g, 6.2%) se obtuvo como un sólido marrón de flujo libre. El contenido IGF-1 del extracto de LWM obtenido se midió a 3.4 µg/g, Tabla 1 de referencia.

Tabla 1. Concentraciones de IGF-1 y TGFβ₂ en el material crudo (es decir, polvo de terciopelo) y extracto de LWM obtenido a partir del material crudo por el proceso de la presente invención.

Factor de Crecimiento	Terciopelo	Polvo de Terciopelo	Extracto LMW
IGF-1	Procesado con Calor	0.18 µg/g	0.32 µg/g
	Liofilizado	1.1 µg/g	3.4 µg/g
TGFβ ₂	Procesado con Calor	7.9 ng/g	47.6 ng/g

Proceso de Extracción *in situ* de LWM a Pequeña Escala Usado en Comparaciones de Condiciones de Extracción

Una cantidad pesada con exactitud (500 mg) de tejido (ciervo de terciopelo, placenta de ciervo, hígado de oveja) o sangre liofilizada de oveja se agregó a un tubo de vidrio equipado con una tapa forrada con teflón. Se agregó suficiente solvente orgánico para proporcionar la relación requerida (v/p) con respecto al material sólido, y la mezcla se agitó en un mezclador Vibramax (IKA) por el periodo requerido de tiempo a temperatura ambiente (20°C). En muchos casos, y a menos que se declare de otra forma, se agregaron 3 ml del solvente (proporción 6:1, v/p), y el mezclado se realizó durante 3 horas. El volumen del solvente orgánico después se removió usando un centrifugador a vacío (Heto) y los restos que permanecieron del solvente orgánico se removieron bajo alto vacío usando un liofilizador (FTS).

Al material de prueba tratado con solvente orgánico se agregó 10 ml de amortiguador acuoso. En muchos casos, y a menos que se declare de otra forma, el amortiguador usado fue amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9). La mezcla se agitó en un mezclador Vibramax (IKA) durante 1 hora a temperatura ambiente (20°C), y después se centrifugó a 2,000 g durante 15 minutos a 4°C. Lo sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 40,000 g durante 15 minutos a 4°C. Lo sobrenadante completamente depurado después se sometió a alícuota en tubos limpios antes del análisis por GFC (como se detalla posteriormente) o para factores de crecimiento. En algunos experimentos, una alícuota de 5.0 ml también completamente se secó en tubos previamente pesados usando un horno a vacío para determinación de rendimientos exactos.

En muchos experimentos, el material de prueba también se extrajo con amortiguador acuoso, como se detalló anteriormente, sin tratamiento anterior con solvente orgánico. Estas muestras sirven como muestras de control para determinar la eficiencia para remover proteínas de alto peso molecular por el pre-tratamiento del solvente.

Análisis de Extractos de Bajo Peso Molecular

Se analizaron los extractos de bajo peso molecular por GFC en una columna Superose 12 HR 10/30 (Amersham Biosciences) usando ya sea amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) que contiene cloruro de sodio a 0.3M y azida de sodio 0.05%, o bicarbonato de amonio a 0.05M para elución. Se disolvieron muestras de extracto sólido en amortiguador de fosfato a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml y se inyectaron 10 µl de cada solución en la columna y se eluyó a una relación de flujo de 0.75 ml/min. Las soluciones del extracto preparadas usando el proceso de extracción *in situ* de LWM a pequeña escala se inyectaron directamente (10 µl) y se eluyeron bajo condiciones similares. Las proteínas se detectaron por medición de la absorción UV a 280 nm.

Se realizó la calibración de peso molecular de la columna Superose 12 por separación de una mezcla estándar de proteínas conocidas de pesos moleculares conocidos bajo las condiciones anteriores. Después se construyó una curva de calibración trazando el logaritmo de peso molecular de proteína contra el tiempo de retención. Se determinaron pesos moleculares aparentes de proteína eluida por interpolación usando la curva de calibración.

Se desarrolló un método de procesamiento de datos automatizados usando Turbochrom 4.1 (PE Nelson) para comparación de las relaciones de proteínas de bajo peso molecular y de alto peso molecular en los extractos. El método resume las áreas de todos los picos que tienen tiempos de retención menos de 20.5 minutos (picos de “alto peso molecular”, debido a proteínas que tienen pesos moleculares mayores que aproximadamente 8,000 Daltons) y aquellos con tiempos de retención mayores que 20.5 minutos (picos de “bajo peso molecular”, debido a proteínas que tienen pesos moleculares menores que aproximadamente 8,000 Daltons) en cromatogramas de muestras eluidas usando amortiguador de fosfato. Para muestras eluidas con bicarbonato de amonio, la división equivalente entre picos de alto peso molecular y bajo peso molecular se realiza a un tiempo de retención de 18.5 minutos.

Técnica Anterior - Preparación de Extracto de Proteína Total de Ciervo de Terciopelo para Análisis de GFC

Polvo de ciervo de terciopelo liofilizado (0.1 g) se mezcló brevemente con 0.05M de amortiguador de fosfato (pH 6.9, 3 ml) por el uso de un mezclador de vórtice. Después de la centrifugación a 2,000 g por 5 minutos la mezcla se sonicó en un baño de limpieza por ultrasonido (Crest Ultrasonics) por 1 hora a 20°C. El extracto de proteína total de este modo preparado se clarificó por centrifugación a 12,700 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante entonces se analizó directamente por GFC -consulte la Figura 1a). El procedimiento de extracto de proteína total se basa en los métodos de la Técnica Anterior para extracción de proteínas como se resume en Scopes, R. K. (1987).

Técnica Anterior - Precipitación de Proteínas de Alto Peso Molecular por Etanol a partir de Extracto de Proteína Total de Ciervo de Terciopelo en la Fase Líquida por Análisis de GFC.

Un extracto de proteína total de ciervo de terciopelo se preparó agitando suavemente polvo seco de ciervo de terciopelo (10 g) en agua desionizada (100 ml) por 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 2,100 g por 15 minutos y el sobrenadante se decantó en una segunda botella centrífuga. Esta se centrifugó a 21,000 g por 15 minutos para clarificar el extracto acuoso, el cual se enfrió luego a 4°C. 100% de etanol frío (3 volúmenes) se agregó gradualmente con agitación constante. La mezcla turbia se centrifugó a 21,000 g por 30 minutos a 4°C para remover la proteína precipitada. El sobrenadante entonces se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio Buchi previo al análisis por GFC-consulte la Figura 2. El procedimiento de extracto de proteína total se basa en los métodos de la Técnica Anterior para extracción de proteínas como se resume en Scopes, R. K. (1987).

Análisis de IGF-1

Se analizaron muestras para determinar el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) por Endolab (Canterbury Health Laboratories) usando un radioinmunoensayo para IGF-1 humano. El ensayo tiene un ED₅₀ de 0.39 µg/g y un límite de detección de 0.02 µg/g para muestras de extracto seco congelado. Para soluciones de extracto, el ED₅₀ del ensayo fue 50 pg/L y el límite de detección fue 4.1 µg/L.

Análisis de IGF-2

Muestras de soluciones de extracto se analizaron para determinar el factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF-2) por Endolab (Canterbury Health Laboratories) usando un radioinmunoensayo para IGF-2 humano. El ensayo tiene un ED₅₀ de 1132 µg/L y un límite de detección de 32 µg/L.

Análisis de Actividad similar a EGF

Muestras de soluciones de extracto se analizaron para determinar la actividad similar al factor de crecimiento epidérmico (similar a EGF) usando un ensayo de radio-receptor. El ensayo mide la capacidad de sustancias en la muestra para desplazar EGF de ratón radioactivamente etiquetado (Amersham) a partir de su receptor en células A431 (línea de células de carcinoma epidermoide) en cultivo. Debido a que otros factores de crecimiento pueden unirse al receptor de EGF, la actividad combinada se mide como la actividad similar a EGF.

Análisis de TGFβ₁

Se analizaron muestras para transformar el factor de crecimiento β₁ (TGFβ₁) usando el Sistema de Inmunoensayo E_{max}® (Promega Corporation). El ensayo fue específico para TGFβ₁ (≤ 1.6% de reactividad cruzada con TGFβ₂ y ≤ 0.7% TGFβ₃) y tiene un límite de detección de 32 pg/ml.

Análisis de TGFβ₂

Se analizaron muestras para transformación del factor de crecimiento β₂ (TGFβ₂) usando el Sistema de Inmunoensayo E_{max}®; (Promega Corporation). El ensayo fue específico para TGFβ₂ (≤ 3% de reactividad cruzada con TGFβ₁ y TGFβ₃) y tiene un límite de detección de 32 pg/ml (equivalente a 0.32 ng/g en muestras sólidas).

RESULTADOS**IGF-1 y TGFβ₂**

Una comparación entre los contenidos de IGF-1 y TGFβ₂ de extractos de bajo peso molecular (es decir, nuevo proceso) preparados de polvo de ciervo de terciopelo procesado por calor y/o liofilizado usando los nuevos procesos de extracción se dan en la Tabla 1 anteriormente. En cada caso los extractos de LWM preparados por el nuevo método tienen concentraciones superiores de IGF-1 y TGFβ₂ inmunorreactivas que se miden en los polvos de ciervo de terciopelo a partir del cual se prepararon.

Distribución de Peso Molecular en Extracto de Ciervo de Terciopelo de Bajo Peso Molecular Usando el Nuevo Proceso de la Presente Invención

El perfil de filtración en gel de un extracto acuoso de polvo de ciervo de terciopelo pre-tratado con 70% de etanol (es decir, preparado usando el nuevo proceso) se compara con un extracto comparable de polvo de ciervo de terciopelo sin

tratar en la Figura 1. Como se puede ver a partir de la Figura 1 (a), las figuras con pesos moleculares aparentes mayores de 10,000 Daltons comprenden el volumen de extracto de proteína total a base de agua obtenida a partir de ciervo de terciopelo a temperaturas no elevadas. En comparación, esencialmente todas estas proteínas de peso molecular superior están ausentes en el extracto de bajo peso molecular preparado usando el nuevo proceso de pre-tratamiento de etanol (Figura 1(b)).

La precipitación de proteínas de alto peso molecular a partir de extracto acuoso estándar de ciervo de terciopelo para aislar péptidos de LWM se realizó en la fase líquida. Este proceso se emprendió para comparar la distribución en peso de proteínas removidas por esta técnica de química de proteína de la técnica anterior estándar con aquella del nuevo proceso de la presente invención. Como se muestra en la Figura 2, la adición de una proporción 3:1 de etanol a una solución acuosa de extracto de proteína total de terciopelo también resultó en remoción esencialmente completa de proteínas que tienen pesos moleculares de más de 10,000 Daltons. La estrecha similitud entre los dos cromatogramas de GFC en las Figuras 1(b) y 2 demuestra que, en el nuevo proceso de extracción de la presente invención, el etanol proporciona el mismo espectro de proteínas de peso molecular superior insolubles (*in situ* dentro del tejido) como lo hace en la fase líquida.

El Efecto de la Concentración de Etanol Usado en el Nuevo Proceso de la Presente Invención

Los perfiles de cromatografía de filtración en gel de las muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas extraídas con 0.05M de amortiguador de fosfato (pH 6.9) después del pre-tratamiento por 3 horas con una proporción 6:1 (v/p) de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de etanol, o sin pre-tratamiento, se muestran en la Figura 3. Esta figura demuestra que a bajas concentraciones (30%, 40%) y una alta concentración (90%) de etanol, la remoción de proteínas de alto peso molecular es menos deficiente que concentraciones intermedias (50-80%).

Como se muestra en la Figura 4, el porcentaje del área pico total combinada que es debido a proteínas de bajo peso molecular alcanza un máximo a aproximadamente 60-70% de etanol. El área absoluta (expresada en V.seg) de los picos de bajo peso molecular, la cual es proporcional a las concentraciones combinadas de las proteínas sustituyentes, declina ligeramente ya que la concentración de etanol se reduce desde 30% hasta 90%. Por el contrario, el área absoluta (expresada en V.seg) de los picos de alto peso molecular declina drásticamente cuando la concentración del etanol se incrementa de 30 a 50%, es estable a un bajo nivel en el intervalo de 50-80% de etanol, y después incrementa nuevamente ligeramente en la muestra preparada usando 90% de etanol.

El Efecto del Tiempo de Incubación Con Etanol en el Nuevo Proceso de la Presente Invención

El experimento anterior se repitió usando pre-tratamiento durante la noche (16.5 horas) del terciopelo con las varias concentraciones de etanol previo a la extracción de amortiguador, en lugar de 3 horas de pre-tratamiento. Como se puede ver comparando la Figura 5 con la Figura 3, el periodo de pre-tratamiento incrementado resulta en solamente un cambio muy ligero en los perfiles de cromatografía de filtración en gel de las soluciones de extracto. El cambio más evidente es la remoción más eficiente de proteínas de alto peso molecular que eluyen de la columna de cromatografía antes de 17 minutos, con relación a las muestras preparadas usando el periodo de pre-tratamiento de 3 horas.

El resultado de variar el tiempo de incubación con 70% de etanol en las relaciones de proteínas de alto peso molecular y bajo peso molecular se muestra en la Figura 6. El área pico absoluta (en V.seg) de las proteínas de bajo peso molecular permanece esencialmente constante por periodos de incubación entre 30 minutos y más de 16 horas (durante la noche), pero como una relación estos picos ligeramente se incrementan con el tiempo. Esto fue debido a un decline gradual concomitante en el área pico absoluta (en V.seg) de las proteínas de alto peso molecular, debido a remoción más eficiente de esta proteína con tiempos incrementados de incubación de etanol.

El Efecto de la Proporción de etanol Usado en el Nuevo Proceso de la Presente Invención

La Figura 7 muestra el efecto de variar la proporción de 70% de etanol usado en el nuevo proceso, entre 2:1 y 10:1 (v/p) con respecto a la cantidad de tejido de ciervo de terciopelo liofilizado extraída. Las relaciones de picos de alto peso molecular y bajo peso molecular en el extracto final permanecen moderadamente constantes a través del intervalo completo, pero las áreas pico absolutas constantemente declinan. El efecto es mayor en el área de los picos debido a las proteínas de bajo peso molecular, lo cual indica una reducción en rendimiento de estas proteínas con relación incrementada de etanol a tejido.

El Efecto del Solvente Orgánico Usado en el Nuevo Proceso de la Presente Invención

La Figura 8 compara el efecto de usar 70% de acetonitrilo, 70% de acetona, 70% de propan-2-ol o 70% de metanol en lugar de 70% de etanol para pre-tratamiento de ciervo de terciopelo liofilizado en los perfiles de proteína de los extractos resultantes de amortiguador de fosfato. Un intervalo muy similar de proteínas de alto peso molecular se pierde en cada uno de los extractos, mostrando que cada solvente es efectivo en el nuevo proceso.

El Efecto de Amortiguador Acuoso Usado en el Nuevo Proceso de la Presente Invención

La Figura 9 compara el efecto de usar agua, 0.05M de cloruro de sodio, 0.05M de amortiguador de citrato (pH 4.1), 0.05M de amortiguador de acetato (pH 4.9), 0.05M de amortiguador tris (pH 7.8) o 0.05M de amortiguador de carbonato

(pH 10.0) en lugar de 0.05M de amortiguador de fosfato (pH 6.9) para la extracción acuosa en los perfiles de proteína de los extractos resultantes. Un intervalo muy similar de proteínas está presente en los extractos preparados a pH casi a neutralidad (usando agua, cloruro de sodio, o tris o amortiguadores de fosfato). Sin embargo, algunas proteínas de alto peso molecular están presentes en extractos preparados a pH inferior (usando amortiguadores de citrato o acetato), mientras en el extracto preparado a pH superior (usando amortiguador de carbonato) un intervalo mayor de proteínas de alto peso molecular es evidente en el perfil de proteína.

Los rendimientos y contenidos de factor de crecimiento de cada uno de los extractos anteriores se dan abajo en la Tabla 2. En cada caso el rendimiento se ha calculado como el peso seco del extracto después de la corrección para el contenido de sales agregadas, y se expresa como un porcentaje del peso de partida del polvo liofilizado de ciervo de terciopelo. Todos los extractos contienen niveles medibles de factores de crecimiento, aunque estos varían de conformidad con el pH del medio de extracción acuosa. La actividad similar a EGF fue particularmente alta en extractos preparados a pH bajo (usando amortiguadores de citrato o acetato) o a pH alto (usando amortiguador de carbonato).

Tabla 2. Rendimientos, Concentraciones de IGF-1, IGF-2, TGF β ₁, TGF β ₂ y similares a EGF en extractos de polvo de ciervo de terciopelo derivados vía el proceso de extracción de LWM de la presente invención.

Amortiguador	Rendimiento	IGF-1 (ng/ml)	IGF-2 (ng/ml)	TGF β ₁ (ng/ml)	TGF β ₂ (ng/ml)	similar a EGF (μ g/ml)
Agua	5.0%	11.5	64	0.31	0.53	75
Cloruro de sodio	7.7%	14.7	88	0.15	0.35	51
Citrato (pH 4.1)	13.5%	9.5	77	0.60	0.57	750
Acetato (pH 4.9)	9.4%	7.5	88	0.12	0.06	623
Fosfato (pH 6.9)	6.3%	13.7	67	0.44	0.22	90
Tris (pH 7.8)	8.6%	16.0	61	0.21	0.44	0
Carbonato (pH 10)	7.3%	25.1	58	0.46	0.54	643

Uso del Nuevo Proceso Con Materiales Distintos de Ciervo de Terciopelo

Los perfiles de cromatografía de filtración en gel de muestras de placenta liofilizada de ciervo, sangre liofilizada de ciervo y de hígado liofilizado de oveja extraídas con 0.05M de amortiguador de fosfato (pH 6.9) después del pre-tratamiento por 3 horas con una proporción 6:1 (v/p) de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de etanol, o sin pre-tratamiento, se muestran en las Figuras 10,11 y 12, respectivamente. Esto demuestra que los pre-tratamientos con un intervalo de concentraciones de etanol (especialmente 70% de etanol) son efectivos para reducir la relación de proteínas de alto peso molecular en extractos acuosos preparados a partir de estos materiales, similar al cuerno liofilizado de ciervo de terciopelo.

El efecto del amortiguador usado para la extracción acuosa de hígado de oveja después del pre-tratamiento por 3 horas con una proporción 6:1 (v/p) de 70% de etanol se muestra en la Figura 13. Como para el ciervo de terciopelo, la extracción de proteínas de alto peso molecular es al menos evidente del hígado de oveja cuando la extracción acuosa se realiza a pH ácido (usando amortiguadores de citrato o acetato).

El nuevo proceso de este modo se muestra por ser aplicable a tejidos y materiales distintos del ciervo de terciopelo.

Uso de Tejido Congelado de Ciervo de Terciopelo en el Nuevo Proceso

La Figura 14 muestra el perfil de filtración en gel de un extracto de LWM preparado a partir de una muestra de tejido de ciervo de terciopelo congelada macerada usando el nuevo proceso de extracción, comparada con aquella de un extracto similar preparado a partir de terciopelo liofilizado. Esencialmente no son evidentes proteínas de alto peso molecular en el perfil de proteína del extracto de la muestra congelada. Esto demuestra que el nuevo proceso reduce significativamente la relación de proteínas de alto peso molecular en extractos acuosos derivados de tejido congelado similares a aquellas del tejido seco.

Discusión

Se ha mostrado que la distribución de peso molecular de proteínas en extractos acuosos preparados a partir de tejido que ha sido pre-tratado con un solvente orgánico (etanol) es similar a aquella obtenida después de la precipitación de proteínas de alto peso molecular a partir de soluciones acuosas de extractos estándares de proteína total por adición del

solvente en el frío.

El nuevo proceso ha sido ejemplificado por el uso de etanol, acetonitrilo, acetona, metanol, y propan-2-ol, pero otros solventes (que incluyen, propan-1-ol, butan-1-ol) podrían esperarse razonablemente ser utilizables.

Ventajas claves del nuevo proceso con relación a la fase líquida son las que

- 5
- usan mucho menos solvente orgánico;
 - no resultan en dilución del extracto de tejido.

10

Esto reduce los peligros involucrados en el uso de un solvente inflamable y también reduce los problemas de manejo de líquido. Además la necesidad de una etapa de clarificación separada para remover proteínas precipitadas, se elimina por el nuevo proceso. Preferentemente, las proteínas de alto peso molecular son simplemente consideradas insolubles *in situ* dentro del tejido. La extracción subsecuente bajo condiciones acuosas entonces resulta en solubilización de solamente proteínas y péptidos de bajo peso molecular.

Una razón clave para el uso preferido de etanol como el solvente orgánico en el nuevo proceso es debido a su actividad anti-microbiana (particularmente a una concentración de 70%). Esto tiene el efecto indeseable de reducir la carga bacteriana de la materia prima de tejido inmediatamente antes de la extracción acuosa.

15

Los altos niveles de actividad de IGF-1, IGF-2, TGF β ₁, TGF β ₂, y similar a EGF en los extractos de LWM de ciervo de terciopelo muestran que la actividad del factor de crecimiento se retiene por el nuevo proceso de extracción. Es de este modo razonable esperar que el nivel de otros factores de crecimiento también sea enriquecido en extractos de tejidos después del pre-tratamiento con etanol.

20

El nuevo proceso ha sido ejemplificado por el uso de ciervo de terciopelo, placenta de ciervo, sangre de ciervo e hígado de oveja. De manera similar, es razonable asumir que las proteínas en tejidos distintos que estos pueden ser similarmente consideradas insolubles por el proceso de pre-tratamiento de etanol, para proporcionar enriquecimiento de las fracciones de bajo peso molecular en extractos acuosos subsecuentes.

25

El uso de tejido de ciervo de terciopelo tanto congelado como seco en el nuevo proceso se ha ejemplificado. De manera similar, es razonable asumir que otros tejidos pueden ser utilizados en el nuevo proceso en ya sea un estado seco o uno no seco (es decir, congelado o fresco).

REFERENCIAS

Scopes, R. K. (1987) "Protein Purification, Principles and Practice, 2nd Edition", Springer Verlag, New York, p 38.

Tani, H., Kamidate, T. and Watanabe, H. (1997) "Micelle-mediated extraction", Journal of Chromatography A, 780: 229-241.

30

Betzing, H. and Lekim, D. (1975) "Process of manufacturing enzyme preparation rich in lipase", Patent GB1454983.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aislar péptidos de bajo peso molecular ("LWM") a partir de tejido *in situ* caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) homogenizar el tejido;
 - 5 b) mezclar el tejido homogenizado con un solvente orgánico para formar una suspensión completamente húmeda;
 - c) reposar o agitar la suspensión para desnaturalizar las proteínas *in situ* dentro del tejido;
 - d) remover el solvente orgánico del tejido;
 - e) mezclar el tejido tratado con solvente orgánico de la etapa d) con un volumen suficiente de agua o una solución acuosa para extraer los péptidos;
 - 10 f) separar un extracto líquido a partir del residuo de tejido de la etapa e) para obtener una solución acuosa que contiene la fracción de péptido de bajo peso molecular removida del tejido.
2. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque previo a emprender la etapa a) el tejido se seca en una pre-etapa.
3. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tejido es liofilizado.
- 15 4. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el solvente orgánico de la etapa b) es etanol.
5. Un proceso como se reivindica de conformidad ya sea con la reivindicación 1 o reivindicación 4, caracterizado porque el solvente orgánico en la etapa b) es 70% de etanol.
- 20 6. Un proceso como se reivindica de conformidad con ya sea la reivindicación 1 o reivindicación 4, caracterizado porque el solvente orgánico en la etapa b) es etanol que tiene una concentración de sustancialmente entre 50%-80% de etanol.
7. Un proceso como se reivindica de conformidad con ya sea la reivindicación 1 o reivindicación 4, caracterizado porque el solvente orgánico en la etapa b) es etanol que tiene una concentración de sustancialmente entre 60%-70% de etanol.
8. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el solvente orgánico de la etapa b) es etanol absoluto el cual se agrega al tejido homogenizado para proporcionar un contenido de agua total de aproximadamente 30% con respecto al volumen de etanol.
- 25 9. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c) la suspensión se deja reposar o se agita por un periodo de al menos sustancialmente 1 hora.
10. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c) la suspensión se deja reposar o se agita por un periodo de sustancialmente 3 horas o más.
- 30 11. Un proceso como se reivindica en ya se la reivindicación 9 o reivindicación 10, caracterizado porque la suspensión se deja reposar o se agita a temperatura ambiente entre 10-30°C.
12. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la etapa adicional d1) en donde el tejido tratado con solvente de la etapa d) es completamente secado previo a emprender la etapa e).
- 35 13. Un proceso como se reivindica en ya se la reivindicación 1 o reivindicación 12, caracterizado porque el tejido tratado con solvente orgánico de las etapas d) o d1) se mezcla con agua o solución acuosa por sustancialmente 1 hora.
14. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el mezclado se realiza a temperatura ambiente la cual no excede 30°C.
- 40 15. Un proceso como se reivindica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la etapa adicional g) en donde las etapas e) a f) son repetidas una o más veces, para mejorar el rendimiento de extracto líquido del residuo de tejido de la etapa e).
16. Un proceso como se reivindica en ya se la reivindicación 1 o reivindicación 15, caracterizado porque el extracto líquido de las etapas f) o g) se seca para obtener un extracto de péptido de bajo peso molecular.
- 45 17. Una mezcla aislada de péptidos de bajo peso molecular caracterizada porque se obtiene por el proceso de conformidad con la reivindicación 1.
18. El uso de un solvente orgánico para desnaturalizar proteínas *in situ* dentro del tejido como parte de un proceso de

extracción para aislar un extracto de péptido de bajo peso molecular del tejido.

19. Una mezcla aislada de péptidos de bajo peso molecular caracterizada porque se obtiene a partir de ciervo de terciopelo.

FIGURA 1

Perfil de cromatografía de filtración con gel de (a) extracto de proteína total de ciervo de terciopelo. (b) extracto LMW de ciervo de terciopelo usando el nuevo proceso de extracción in situ. Se proporciona una escala de peso aproximado debajo de los cromatogramas.

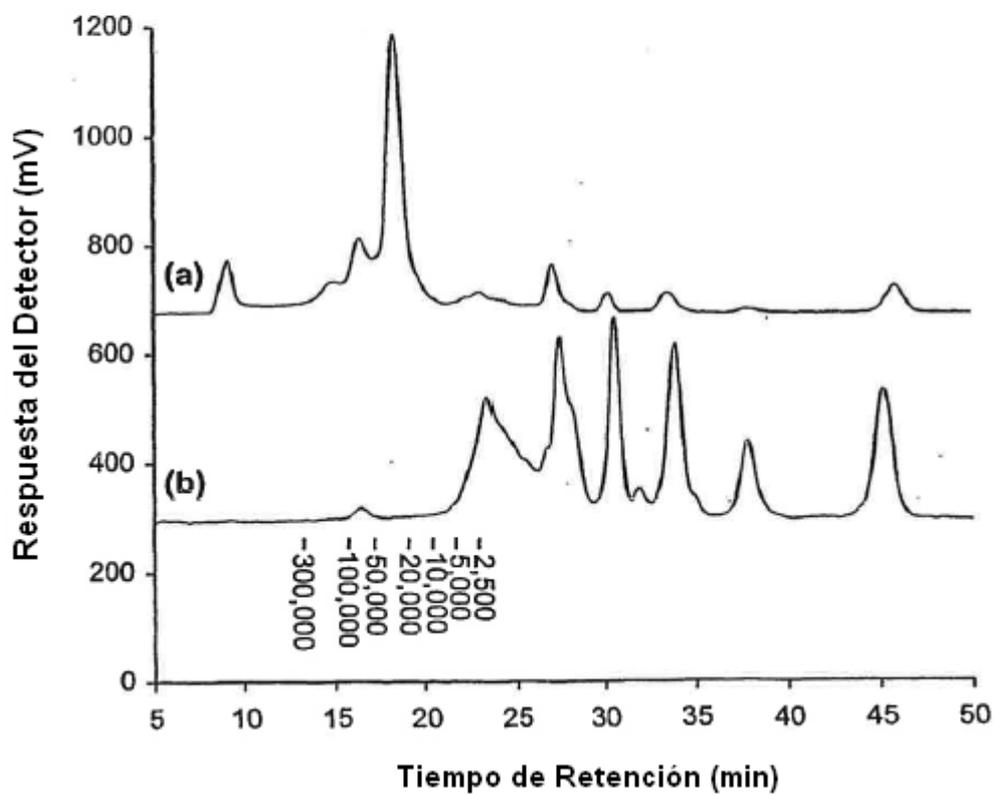


FIGURA 2

Un extracto LMW preparado por precipitación de proteínas de peso molecular alto a partir de extracto de proteína total de ciervo de terciopelo por adición de etanol frío en la fase líquida

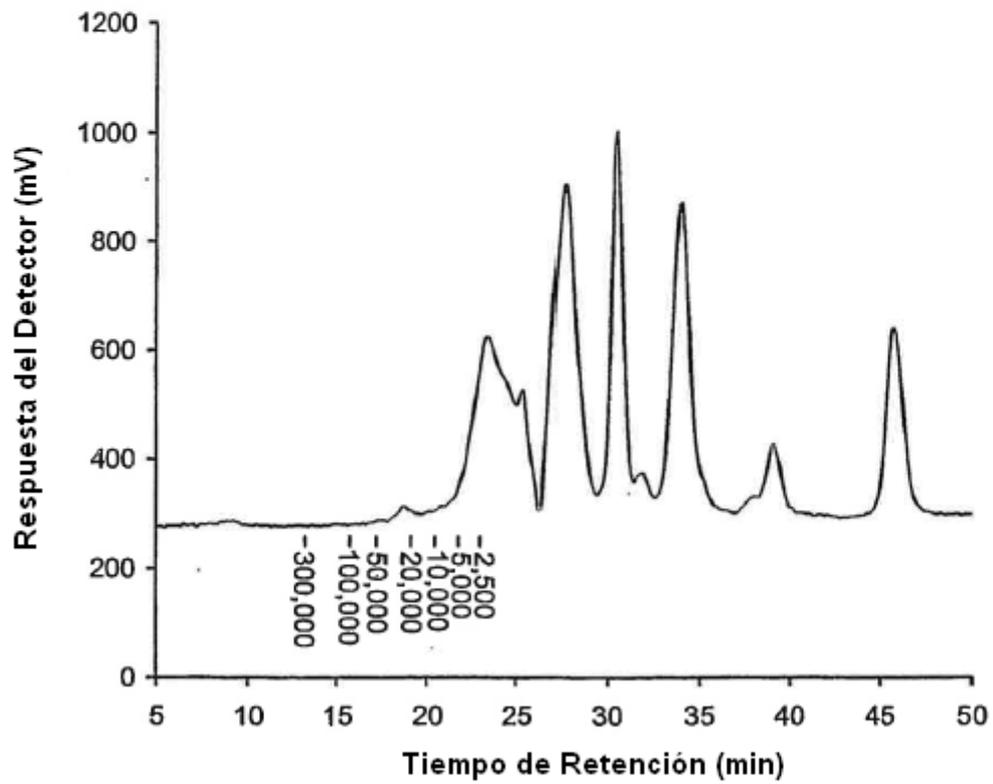


FIGURA 3

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/p) con etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, o sin pre-tratamiento (etanol al 0%).

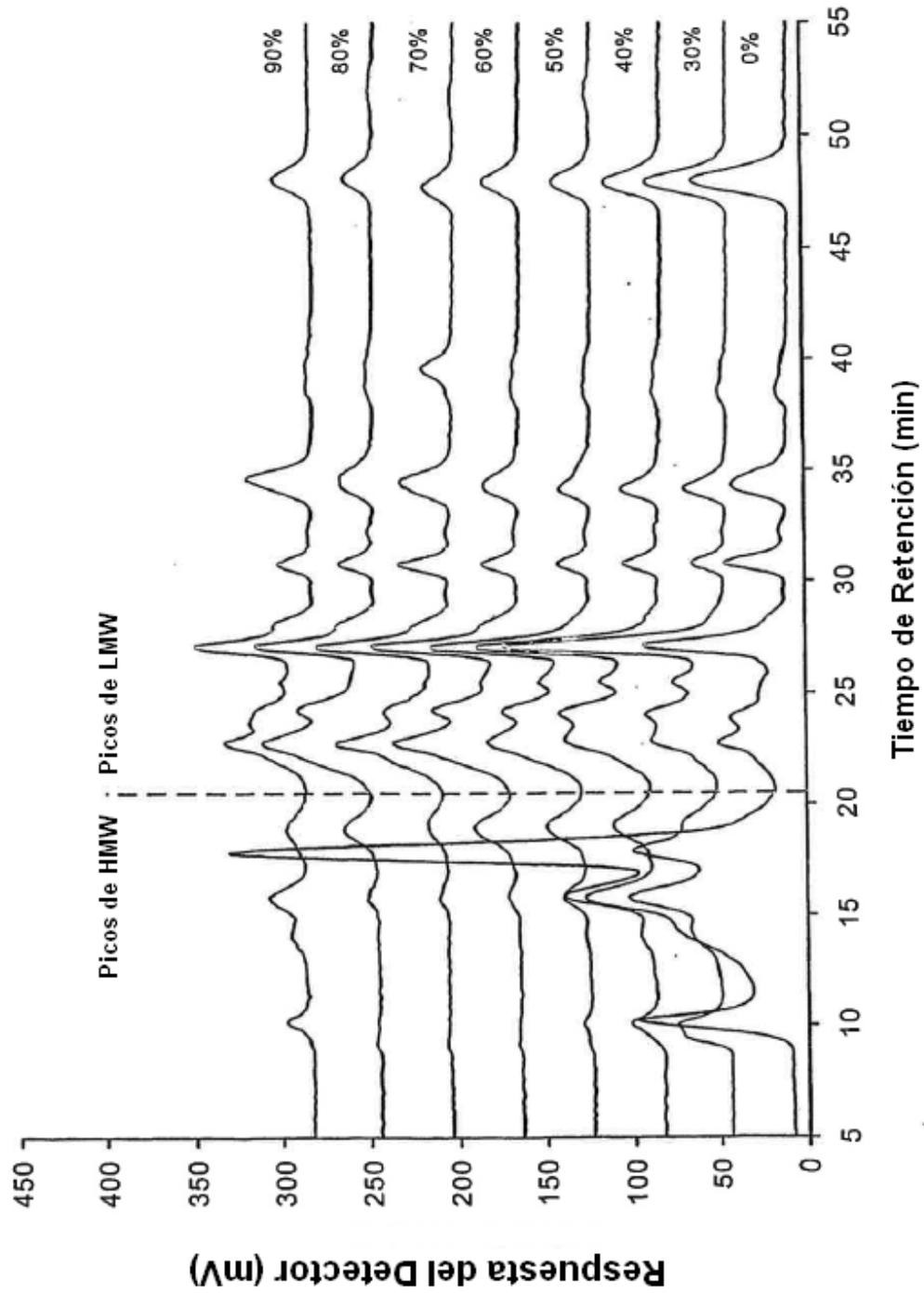


FIGURA 4

Una gráfica que muestra el efecto del pre-tratamiento de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas con etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% (6:1 p/v), antes de la extracción con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9), en las áreas totales de picos de proteínas de peso molecular bajo o alto en las soluciones del extracto.

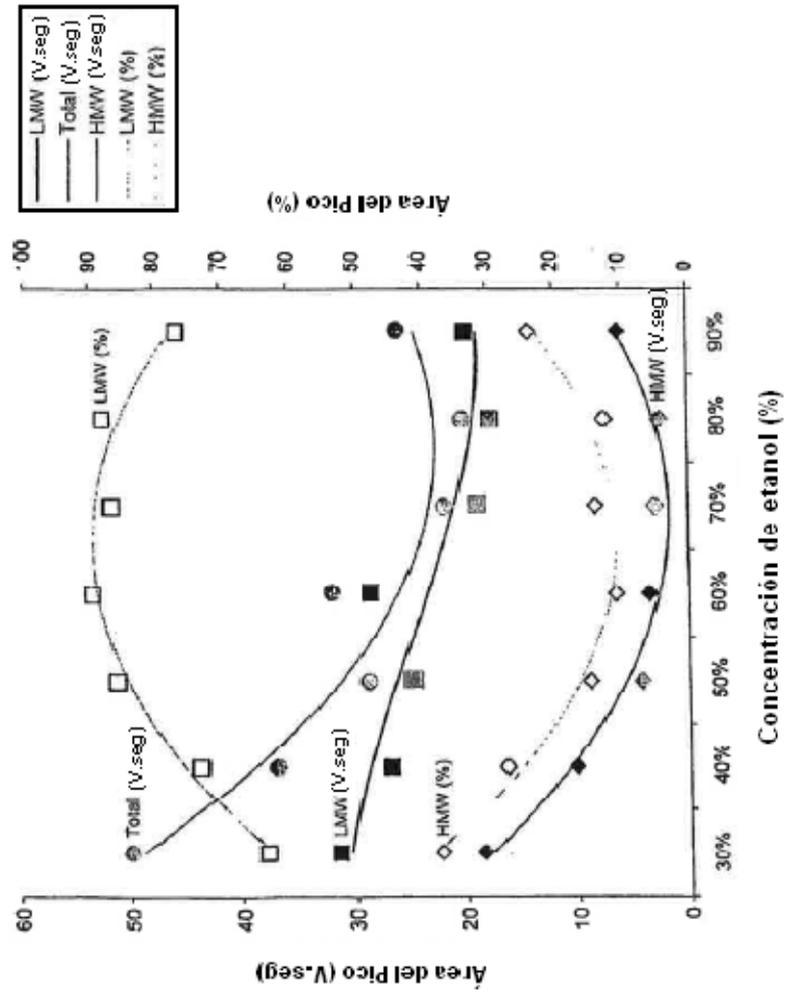


FIGURA 5

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 16.5 horas con una proporción 6:1 (p/v) de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 80% o 90%, o sin pre-tratamiento (0% de etanol).

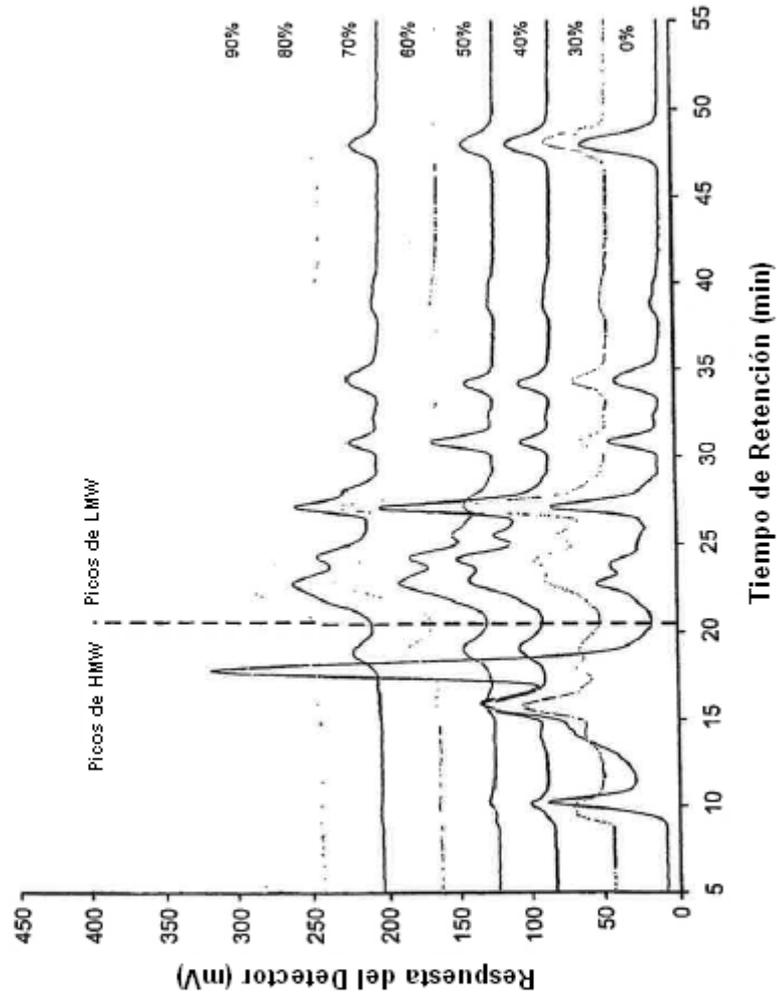


FIGURA 6

Una gráfica que muestra el efecto del tiempo de incubación usado para el pre-tratamiento de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas con etanol al 70%, antes de la extracción con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9), en las áreas totales de picos de proteínas de peso molecular bajo y alto en las soluciones del extracto

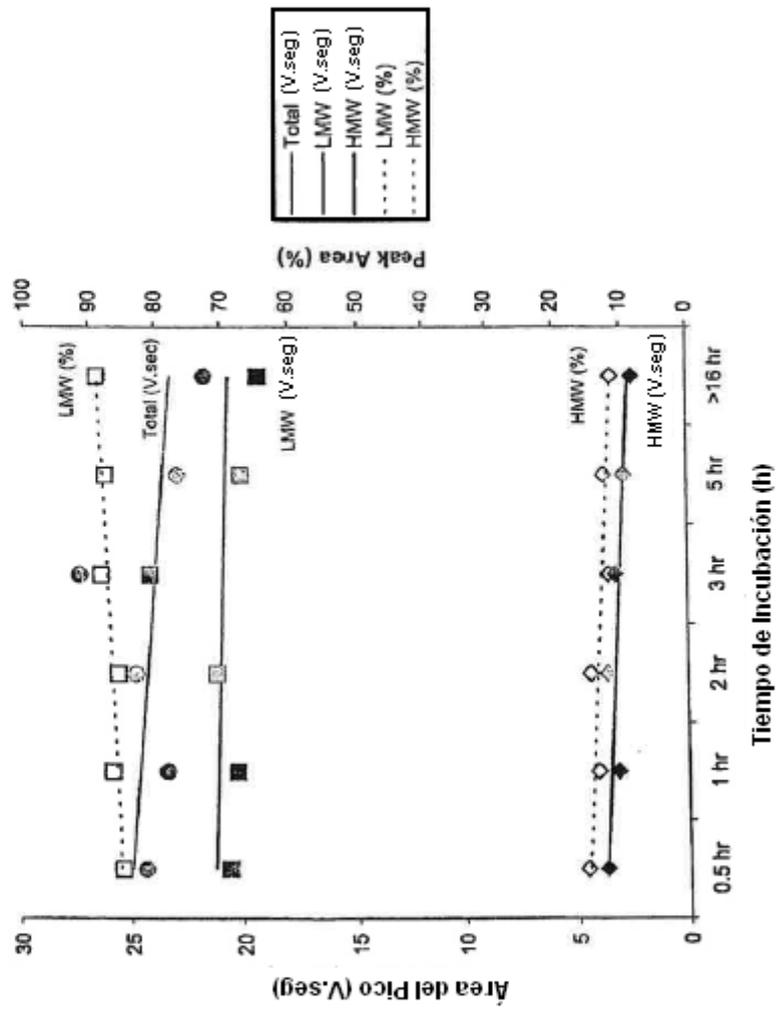


FIGURA 7

Una gráfica que muestra el efecto de la proporción (v/v) del etanol al 70% usada durante 3 horas de pre-tratamiento de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas, antes de la extracción con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9), en las áreas totales de picos de proteínas de peso molecular bajo y alto en las soluciones del extracto.

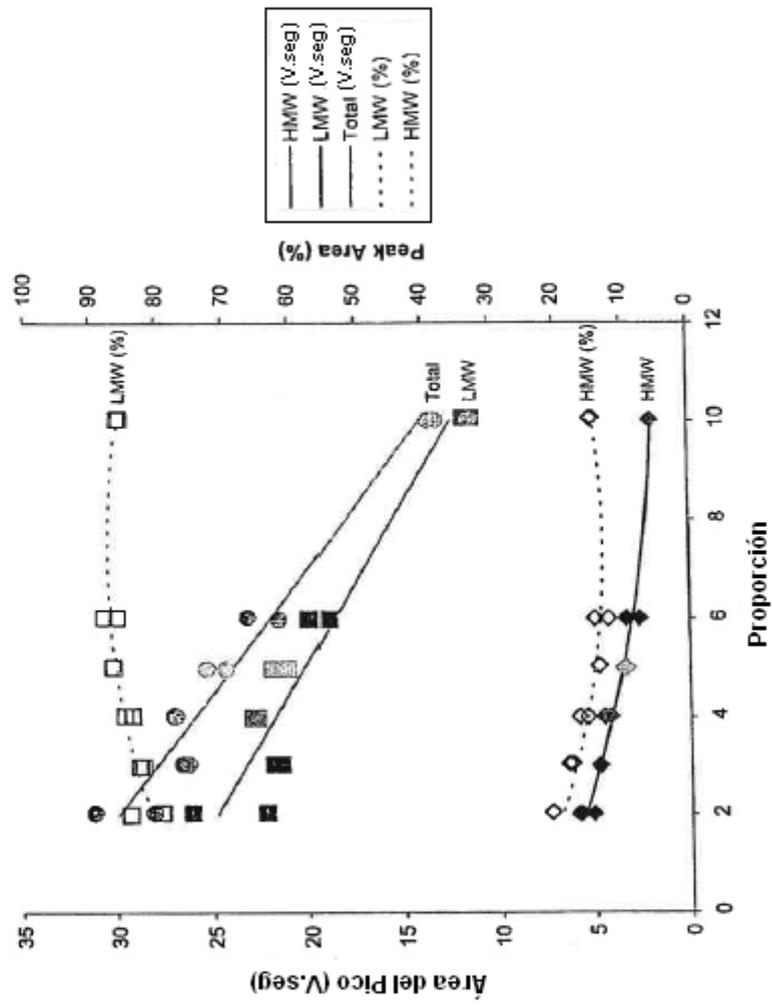


FIGURA 8

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/v) de acetonitrilo al 70%, acetona al 70%, propan-2-ol al 70%, etanol al 70% o metanol al 70%, o sin pre-tratamiento con solvente orgánico.

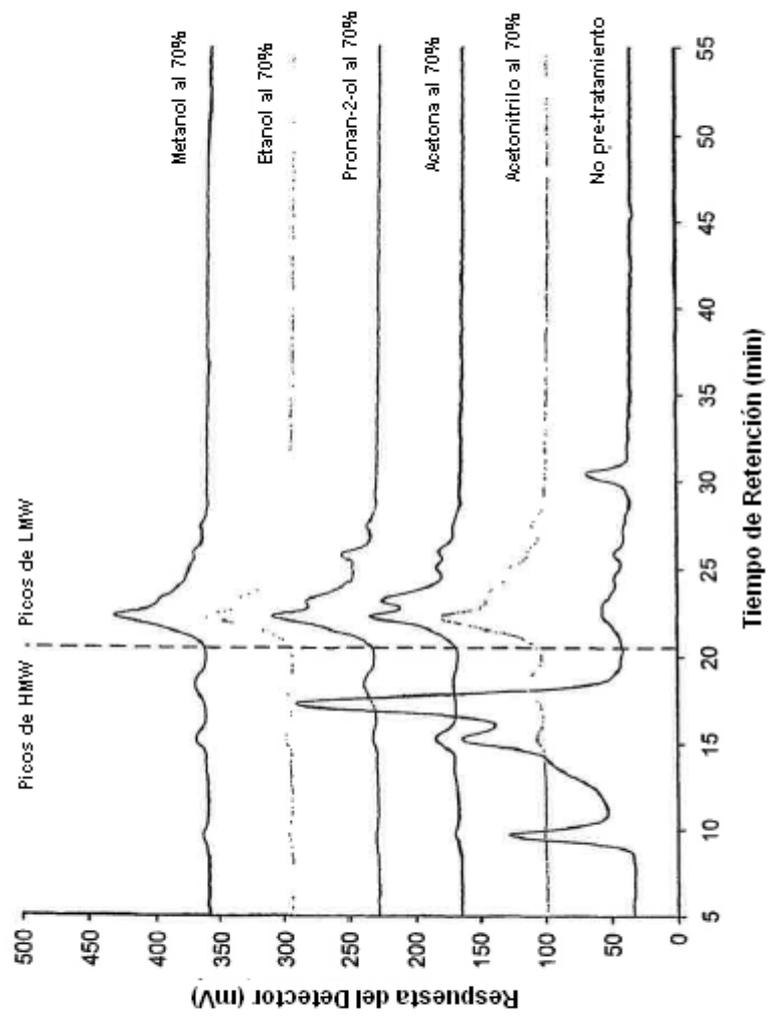


FIGURA 9

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de ciervo de terciopelo liofilizadas con varios amortiguadores (cada uno 0.05M) o con cloruro de sodio 0.05M o agua, después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/v) de etanol al 70%.

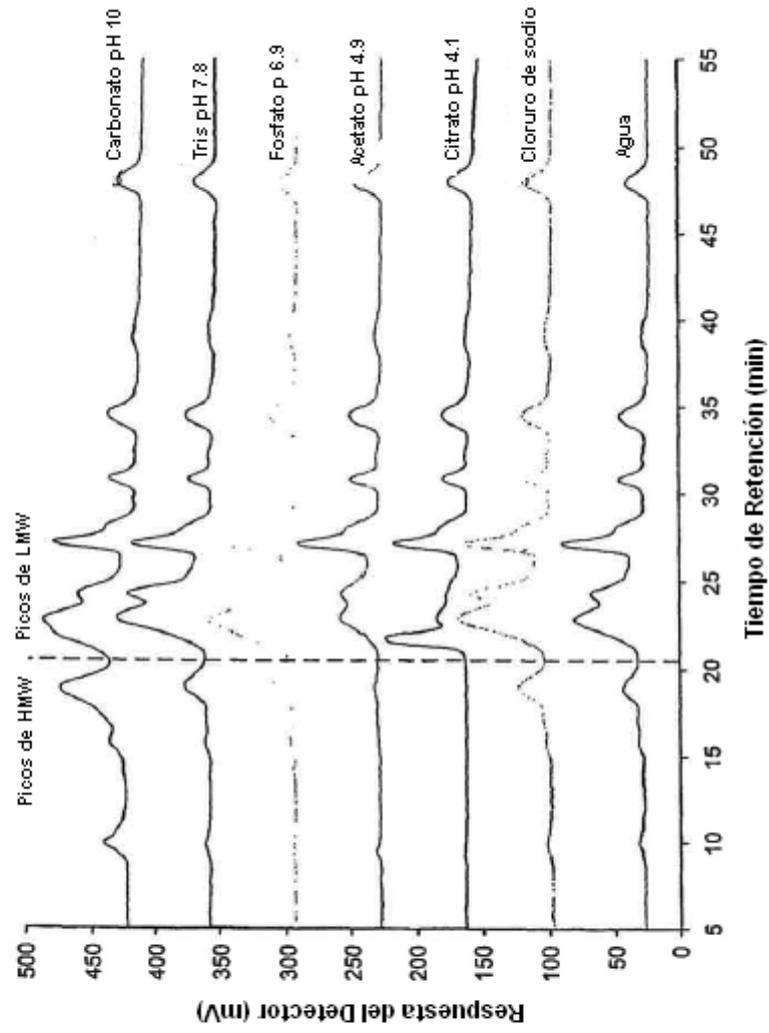


FIGURA 10

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de placente de ciervo liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/v) de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, o sin pre-tratamiento (0% de etanol)

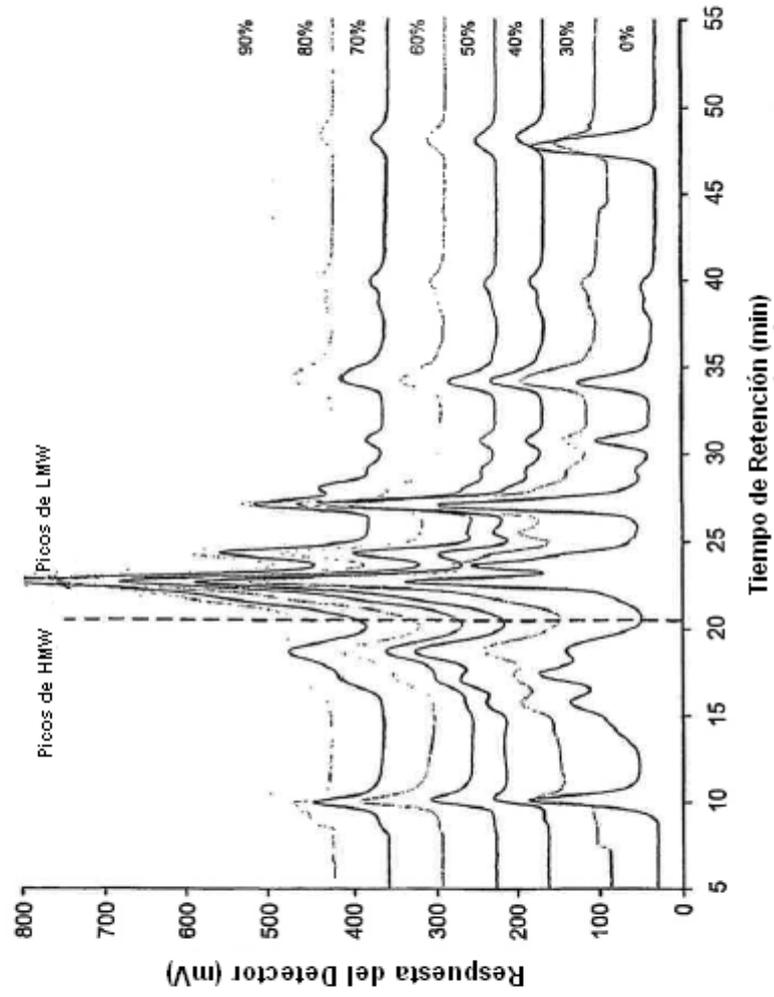


FIGURA 11

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de sangre de ciervo liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/v) de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o sin pre-tratamiento (0% de etanol).

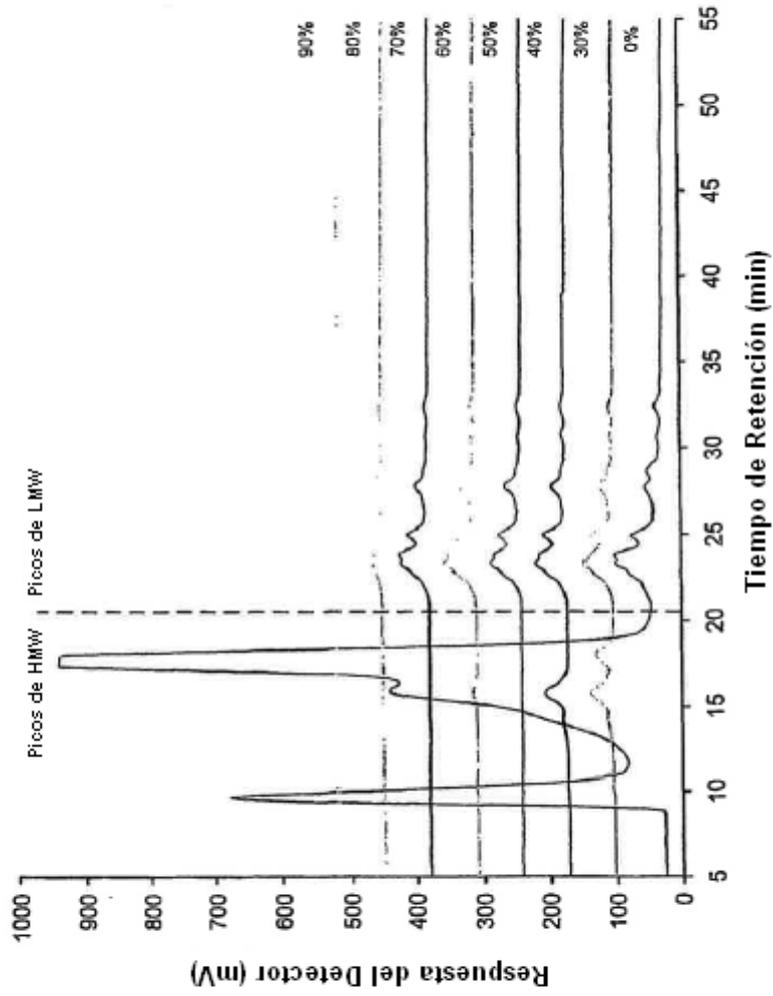


FIGURA 12

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de hígado de oveja liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (v/v) de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o sin pre-tratamiento (0% de etanol).

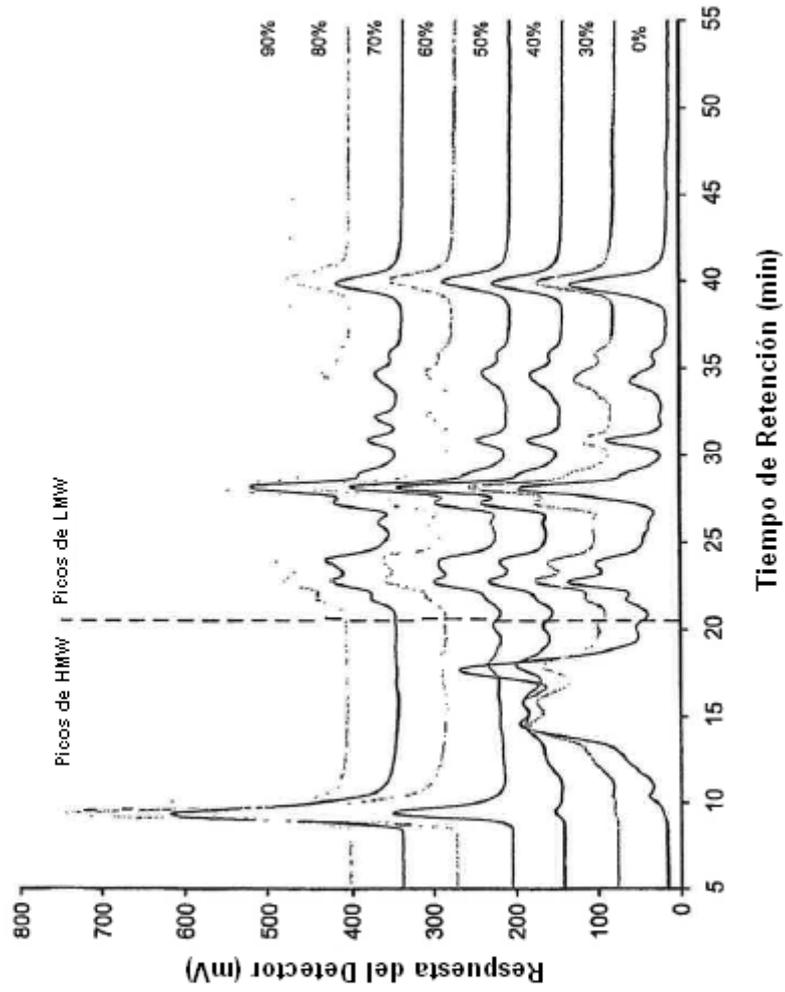


FIGURA 13

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de hígado de oveja liofilizadas extraídas con varios amortiguadores (cada uno 0.05M) o con agua, después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (p/v) de etanol al 70%.

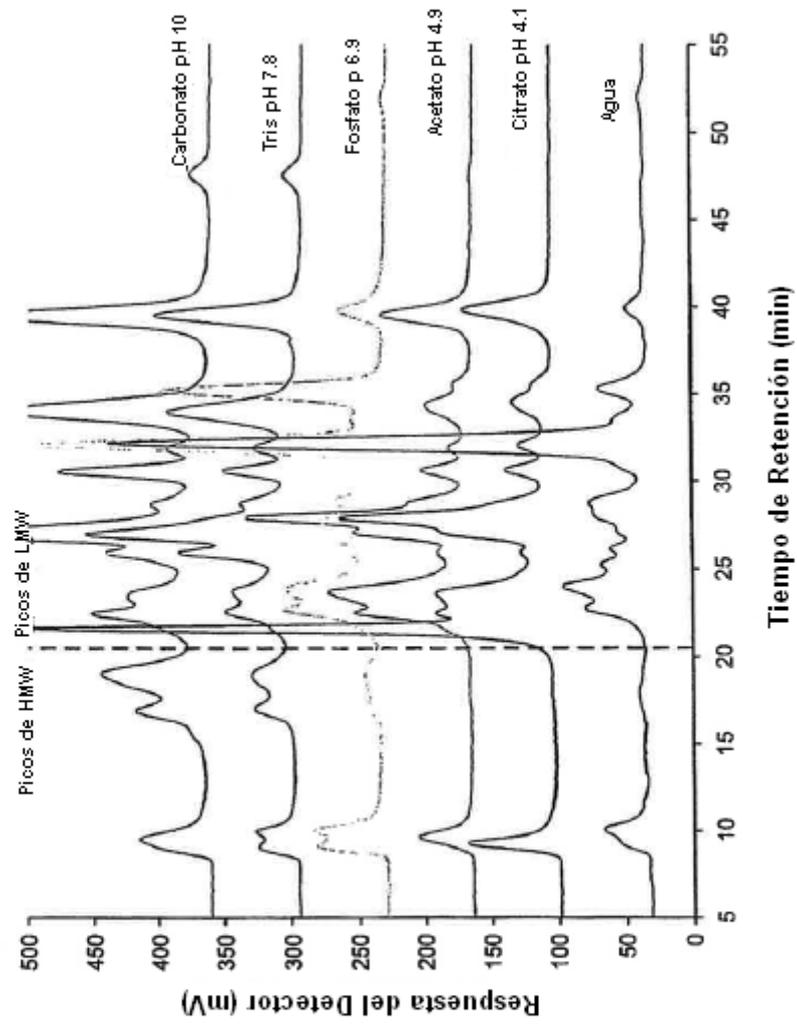


FIGURA 14

Perfiles de cromatografía de filtración con gel de muestras de ciervo de terciopelo congeladas y liofilizadas extraídas con amortiguador de fosfato a 0.05M (pH 6.9) después del pre-tratamiento durante 3 horas con una proporción 6:1 (vp) de etanol al 70%, comparado a una muestra de ciervo de terciopelo liofilizado similarmente extraído sin pre-tratamiento de etanol.

