

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 666**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07713973 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1985623**

54 Título: **Procedimiento para producir un proteoglicano**

30 Prioridad:

14.02.2006 JP 2006036277

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2013

73 Titular/es:

**KUSHIRO INDUSTRIAL TECHNOLOGY CENTER
(33.3%)
2-23, Tottoriminami 7-chome
Kushiro-shi, Hokkaido 084-0905, JP;
KUDO, YOSHIAKI (33.3%) y
BIOMATEC JAPAN, INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KUDO, YOSHIAKI y
NARUMI, MASAKI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 431 666 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

Procedimiento para producir un proteoglicano

Campo técnico

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para producir un proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1, que es útil como un material para producir productos farmacéuticos, suministros médicos, cosméticos, productos alimenticios y productos industriales, etc., incluyendo las etapas de extraerlo a partir de una muestra biológica que contiene un proteoglicano, por ejemplo un tejido de cartílago de un pez, un molusco, un ave y un mamífero y para producirlo a partir de éste.

10 El de proteoglicano es un nombre general que se refiere a una glicoproteína con unos tipos de estructuras muy complejas y múltiples y generalmente se compone de una proteína de un único núcleo con desde varias unidades hasta varias decenas de unidades de cadenas lineales de azúcares, unidas por enlaces covalentes. La cadena de azúcar más típica que se incluye en un proteoglicano encontrado en un tejido de cartílago es el sulfato de condroitina.

15 El sulfato de condroitina es un componente que llama la atención en la industria a la vista de su alta utilidad, tal como la de tener unas propiedades hidratantes, una biocompatibilidad y unas propiedades lubricantes, y se han desarrollado el sulfato de condroitina y muchos procedimientos para su recuperación y preparación eficiente a partir de fuentes naturales.

20 En tejidos de cartílagos, el sulfato de condroitina no está presente a solas como tal. En vez de ello, está presente en una forma compleja con una proteína, es decir en la forma de un proteoglicano. A este respecto, la extracción de un proteoglicano sin ningún cambio es con frecuencia difícil debido a la estructura complicada de un compuesto complejo de glicoproteínas. Por dicho motivo, se ha empleado típicamente un procedimiento para extraer solamente el sulfato de condroitina, después de haber degradado por completo la porción de una proteína de núcleo de un proteoglicano. El producto de dicho procedimiento es un mucopolisacárido tal como sulfato de condroitina, etc.

25 Mientras tanto, también se han hecho esfuerzos para recuperar, preparar y usar el propio proteoglicano en lugar del sulfato de condroitina. Especialmente en tejidos de cartílagos de un pez, un ave y un mamífero, se incluye un proteoglicano que tiene el sulfato de condroitina como la cadena de azúcar principal. Más aun, a la vista del hecho de que dichos tejidos de cartílagos han sido desechados generalmente como un producto de desecho, se propusieron varios procedimientos de producir un proteoglicano a partir de tejidos de cartílagos, también como una manera efectiva de utilizar este producto de desecho.

30 Por ejemplo, se ha informado de unos métodos en los que un proteoglicano es extraído a partir del cartílago nasal de un salmón usando hidrocloreuro de guanidinio (Documento de Patente 1) y usando ácido acético (Documento de Patente 2). Sin embargo, desafortunadamente, no se puede decir que unos métodos convencionales tales como éstos estén al nivel de una aplicación comercial puesto que es bastante alto el costo implicado para la extracción y la purificación.

35 Documento de Patente 1: Solicitud de patente japonesa abierta a la inspección del público nº 2001-172296

Documento de Patente 2: JP-A nº 2002-69097

40 El documento de solicitud de patente europea EP 0 013 851 A1 se refiere a un procedimiento para producir proteoglicanos de membranas de bacterias. Esta cita de referencia describe también que una bacteria gram-negativa es preferible como tal bacteria. El contenido de proteínas es de más que un 30 %. Los proteoglicanos descritos se producen sumergiendo una muestra en una solución alcalina que tiene una concentración comprendida entre 0,05 y 2 M, de manera preferible de 0,1 M. Esta cita de referencia describe además, para después del tratamiento con la solución alcalina, las etapas de neutralizar y luego tratar con un ácido tal como ácido clorhídrico a una temperatura de 70-100°C.

45 Nishikiori T., y colaboradores "Suisan Riyo Kako ni Kansuru Shiken Kenkyu 2 Suisan ikibutsu no Kinosei Toshitsu Riyo Gijutsu Kaihatsu Shiken", Hokkaido Kushiro Fisheries Experimental Station (Pesquerías Estación Experimental) Jigyo Hokokusho, volumen 1999, 2000, páginas 128-129 describen un procedimiento para producir un proteoglicano a partir de un pez, en el que la muestra se sumerge en diversas soluciones de NaOH a 40°C.

Descripción del invento

Problema que ha de ser resuelto por el invento

5 Un objeto del presente invento es el desarrollar un procedimiento de bajo costo para producir un proteoglicano ingerible por vía oral a partir de un pez, un molusco, un ave o un mamífero, especialmente a partir de sus porciones desechadas.

Medios para resolver los problemas

10 Los autores del presente invento han encontrado que por uso de una solución alcalina, que ha sido considerada como inapropiada para la recuperación y la preparación de una proteína y de un complejo proteínico, en ciertas condiciones se puede recuperar eficientemente un proteoglicano que es un compuesto complejo de glicoproteínas a partir de un tejido de cartílago y de otras muestras biológicas que contienen proteoglicanos, y por lo tanto completaron cada una de las etapas del invento que se describen seguidamente.

15 (1) Un procedimiento para producir un proteoglicano, que comprende las etapas de:
sumergir una muestra biológica que contiene un proteoglicano que está presente en una forma compleja con una proteína, y unas cadenas de condroitina o sulfato de condroitina, en una solución alcalina de desde 0,01 N hasta 0,05 N a 0°C hasta 10°C; y recuperar la solución alcalina que incluye dicho proteoglicano, obtenida a la terminación de la inmersión después de que los materiales residuales hayan sido eliminados desde el extracto.

(2) El procedimiento descrito en la etapa (1) anterior, que incluye además la operación de separar un proteoglicano a partir de la solución recuperada.

20 (3) El procedimiento descrito en la etapa (1) o (2) anterior, en el que la solución alcalina es una solución de una sal de un metal alcalino.

(4) El procedimiento descrito en una cualquiera de las etapas (1) hasta (3) anteriores, en el que la muestra biológica que contiene un proteoglicano es un tejido de cartílago, fibrillas musculares o un cuero de un pez, un molusco, un ave o un mamífero.

25 (5) El procedimiento descrito en la etapa (4) anterior, en el que la muestra biológica que contiene un proteoglicano es un tejido de cartílago de un pez, un ave o un mamífero.

Efecto del invento

30 Cuando se compara con el método de extracción convencional, de acuerdo con el procedimiento del presente invento, un proteoglicano puede ser recuperado con facilidad en una forma inalterada y no descompuesta dentro de un breve período de tiempo, consiguiéndose de esta manera una reducción sustancial del coste de producción del proteoglicano. Además, un proteoglicano muy útil en la industria se puede recuperar a partir de las porciones residuales de un pez, un ave o un mamífero que han sido desechadas principalmente, contribuyendo de esta manera a una utilización efectiva de desechos industriales y a una reducción del volumen de los desechos industriales propiamente dichos.

35 Además, en el presente invento, no se tiene que añadir necesariamente un agente inhibidor de enzimas proteolíticas para desactivar una enzima proteolítica que está incluida en tejidos biológicos. Puesto que dicho agente inhibidor no siempre es efectivo para cualquier enzima proteolítica, y muchos agentes inhibidores como tales son perjudiciales para los seres humanos, es indeseable usar un agente inhibidor para producir un proteoglicano como un material de un producto alimenticio. A este respecto, puesto que no se requiere dicho agente inhibidor en el presente invento, los anteriores problemas pueden ser evitados.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es un diagrama que muestra la cantidad de un proteoglicano que se ha recuperado por uso de hidróxido de sodio y de ácido acético.

Mejor modo para llevar a cabo el invento

45 El presente invento se dirige a un método para la extracción y la preparación de unas proteínas que contienen proteoglicanos, que generalmente son inestables bajo el calor y en una solución alcalina, que se basa en la idea de usar una solución alcalina, lo cual, sin embargo, está claramente en contra de las creencias convencionales.

Un proteoglicano es un compuesto complejo de un azúcar y una proteína. Sin embargo, puesto que la cadena de azúcar unida a la proteína del núcleo tiene una débil unión, estos radicales tienden a resultar separados con facilidad unos de otros. Por dicho motivo, la extracción o purificación de un proteoglicano es extremadamente difícil de por sí y se requiere un enfoque más cuidadoso en comparación con un colágeno que se compone solamente de una proteína, o del sulfato de condroitina que se compone solamente de un hidrato de carbono. Por lo tanto, los procedimientos convencionales no son apropiados para una producción a gran escala de un proteoglicano, debido a unas etapas de funcionamiento complicadas o manuales, etc.

Además de lo antedicho, las proteínas son generalmente inestables bajo la acción del calor, de los ácidos y, especialmente, de los álcalis, y por lo tanto son desnaturalizadas y degradadas con facilidad. Basándose en dicha propiedad de las proteínas, se conoce un método de degradar las proteínas usando de manera agresiva un álcali. Sin embargo, no se ha conocido que un proteoglicano, que es un compuesto complejo de glicoproteínas, pueda ser extraído con un álcali mientras que las porciones proteínicas del mismo estén protegidas con respecto de una degradación.

El procedimiento del presente invento puede ser aplicado a una muestra biológica que contiene un proteoglicano, tal como un tejido de cartílago, fibrillas musculares o un cuero de un pez, un molusco, un ave o un mamífero. De manera preferible, sin embargo, es aplicado a un tejido de cartílago de dicha muestra. El tejido de cartílago usado en el presente invento puede ser el de un pez, un ave o un mamífero, especialmente unas porciones desechadas del mismo. El concepto de tejido de cartílago descrito en el presente invento significa un tejido de cartílago propiamente dicho, o todos los otros tejidos contenidos en una región que rodea al tejido de cartílago, tal como un hueso, fibrillas musculares y un cuero, etc.

De acuerdo con el presente invento se usa preferiblemente un tejido de cartílago nasal de un salmón, que está contenido en un peso promedio de aproximadamente 6 % en la cabeza de un salmón y usualmente es citado en Japón como "hiz". Cuando los salmones son atrapados a partir del mar cercano a Hokkaido (ellos son en su mayor parte los salmones que pertenecen a la especie *Oncorhynchus keta*) y elaborados, sus partes de cabeza son consideradas generalmente como un material de desecho. Aunque algunas de las partes de cabeza separadas son elaboradas para producir un polvo de pescado, ellas son desechadas en su mayor parte como un residuo industrial. Por lo tanto, el "hiz" puede ser obtenido de una manera conveniente y estable a partir de dicho material de desecho con un bajo costo.

De acuerdo con el presente invento, además del "hiz" más arriba descrito, se puede usar un tejido de cartílago que se origina a partir de un pez tal como una raya y un tiburón, etc.; un tejido de cartílago que se origina a partir de un ave tal como un pollo de corral; y un tejido de cartílago que se origina a partir de un mamífero, tal como un cartílago del cuello o de los bronquios de una vaca o un cartílago de una ballena, etc. Además, se ha conocido que un proteoglicano es encontrado también en la epidermis de un molusco tal como un calamar o un octopus, se puede usar también la piel externa de dicho molusco. Especialmente para la epidermis de un calamar, se ha informado de que se ha encontrado un compuesto complejo de proteínas y condroitina que está casi exento de cualquier cantidad de sulfato, y que dicha condroitina constituye un 70 % o más de los mucopolisacáridos encontrados en la epidermis de un calamar (Suyama y colaboradores, "Uso de un calamar", publicado en Noviembre de 1980, página 93, Kouseisha). Por lo tanto, las pieles externas de un calamar son útiles como un ejemplo de una muestra biológica que contiene un proteoglicano en el presente invento. La mayor parte de las muestras biológicas que contienen un proteoglicano, más arriba descritas, son materiales de desecho industriales, de manera tal que ellas se pueden obtener con facilidad. Estos materiales son cortados preferiblemente a un tamaño lo más pequeño que sea posible con el fin de aumentar su área de superficie para la mejor extracción de una cierta cantidad de un proteoglicano, antes de su inmersión en una solución alcalina, como se describe más abajo.

Con respecto a la solución alcalina del presente invento, se pueden usar apropiadamente una solución acuosa tal como una solución acuosa de un metal alcalino o de sales del mismo y una solución acuosa de un metal alcalino térreo o de sales del mismo. Sin embargo, en términos de eficiencia para la extracción de proteoglicanos y de conveniencia para un tratamiento posterior, etc., se usa una solución acuosa de un metal alcalino, a saber, se usan de manera preferible hidróxido de sodio (NaOH), hidrógeno carbonato de sodio, carbonato de calcio e hidróxido de potasio. De manera sumamente preferible se usa hidróxido de sodio.

La concentración de la solución alcalina es de desde 0,01 N hasta 0,05 N. Cuando se usa una solución alcalina de desde 0,01 N hasta 0,05 N, se prefiere que la inmersión se lleve a cabo durante aproximadamente 9 horas.

De acuerdo con dichas condiciones de tratamiento, se puede recuperar y preparar un proteoglicano con un peso molecular más alto.

La inmersión de un tejido de cartílago en una solución alcalina se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 0°C y 10°C, y de manera más preferible entre 0°C y 4°C. Especialmente cuando la temperatura de inmersión se ajusta entre 0°C y 4°C, el proteoglicano apenas es degradado, de manera tal que puede ser extraído como un compuesto complejo polimérico de glicoproteínas.

La inmersión se puede llevar a cabo usando de la solución alcalina un peso múltiplo de desde 2 hasta 15 veces, de manera preferiblemente 4 a 12 veces, más preferiblemente de 6 hasta 12 veces, en comparación con el peso del tejido de cartilago. Preferiblemente, la inmersión se lleva a cabo con agitación mediante un dispositivo mezclador o agitador.

5 La extracción de un proteoglicano a partir de un tejido de cartilago se puede vigilar detectando y cuantificando la cantidad de ácido urónico de acuerdo con un método conocido tal como el método de Galambos, (John y colaboradores, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1967, volumen 19, página 119-132). Sin embargo, se pueden usar también otros métodos conocidos para detectar y vigilar el ácido urónico.

10 En la solución alcalina obtenida, al haberse terminado la inmersión, están contenidas unas grandes cantidades de residuos después de la extracción de un proteoglicano. Como tales, ellos son eliminados preferiblemente por filtración, centrifugación y otros métodos. Un extracto que incluye un proteoglicano se puede usar tal como está como el producto. Sin embargo es preferible que él sea aislado y purificado por un método apropiado hasta alcanzar el nivel de pureza que se requiere para los diversos usos del mismo.

15 De acuerdo con el presente invento, no se requiere necesariamente un método especial para la purificación de un proteoglicano. Sin embargo, se menciona una centrifugación como el método preferido. Por medio de un proceso de centrifugación se puede separar convenientemente un material sólido fino en la forma de productos residuales precipitados, y unas porciones oleosas del material en bruto se pueden separar convenientemente como una materia flotante sobre la superficie.

20 Además, una fase líquida que contiene un proteoglicano, que se ha recuperado por centrifugación, puede ser filtrada adicionalmente por uso de un papel de filtro o de un aparato de separación para una membrana de ultrafiltración que tiene un apropiado peso molecular de corte, etc. Para el peso molecular de exclusión de tamaños, se puede usar un intervalo que se extiende por un intervalo de desde aproximadamente 50.000 Dalton hasta 1.000.000 Dalton. Para dicho proceso, si se usa un filtro que tiene un peso molecular de corte de 500.000 Dalton o más, incluso se puede eliminar un colágeno desde la fase líquida, de manera tal que se puede mejorar la pureza del proteoglicano.
25 Además, disminuyendo la viscosidad de la fase líquida por adición de agua a la fase líquida que incluye un proteoglicano, se puede facilitar la penetración a través de la membrana. Más aun, repitiendo este proceso se puede eliminar también el olor a pescado que se genera ligeramente durante el proceso.

30 Además, por adición del material concentrado obtenido de esta manera a un etanol que está saturado con cloruro de sodio, se puede recuperar un proteoglicano en el estado de un gel. Dicho proteoglicano en el estado de un gel puede ser conformado para dar un material sólido por uso de un aparato liofilizador en vacío. Alternativamente, puede ser secado usando un secador por atomización para dar un sólido en forma de polvo.

Aquí, a continuación, el presente invento se describe con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

35 <Ejemplo 1>

Un cartilago nasal extraído de una parte de la cabeza de un salmón *Oncorhynchus keta*, que había sido congelado y almacenado a -40°C, se picó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en una forma finamente desmenuzada. 200,00 g de dichos trozos finamente desmenuzados se usaron como un material de
40 partida. A un recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 2.397,60 g de agua destilada, que previamente se había enfriado a 0°C y se añadieron a esto además 2,40 g de hidróxido de sodio sólido para preparar 2.400,00 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,025 N). A este recipiente de extracción se le añadió el material de partida más arriba descrito (200,00 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba su contenido con un dispositivo agitador.

45 Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, por encima del que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm), de manera tal que se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.500 rpm (revoluciones por minuto) usando una centrifugadora (IWAKI, tipo CFS-400). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

50 Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana

de PREP/SCALE TFF (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

5 Se tomó una fracción del material concentrado obtenido de esta manera y se usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 200,00 g del material de partida se habían obtenido 6,64 g de un material sólido secado, que corresponde a un 3,32 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

10 Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer, fabricado por Hitachi Ltd.) con el fin de cuantificar la cantidad de colágeno que está contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano.

Todavía además, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (con una columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

15 Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 25,0 % de proteínas, 21,5 % de un contenido de cenizas, 52,9 % de hidratos de carbono y 0,6% de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Puesto que la cantidad de hidratos de carbono encontrada por el presente ensayo era de aproximadamente 52,9 %, se presume que el proteoglicano del presente invento tiene una pureza de aproximadamente 57 %. Además, se encontró que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 2.200.000 Dalton.

20 Con respecto a los procesos operativos descritos para el Ejemplo anterior, la concentración de hidróxido de sodio se cambió a 0,0025 N, 0,025 N o 0,05 N y se usó ácido acético 0,666 N en vez de hidróxido de sodio para la inmersión y la extracción durante 24 horas. Como resultado, el cambio observado en la cantidad recuperada de proteoglicano (es decir, en la cantidad de ácido urónico) en el curso de este intervalo de tiempo, se muestra en la Fig. 1.

25 <Ejemplo 2>

Un cartílago nasal extraído de una parte de la cabeza de un salmón *Oncorhynchus keta*, que había sido congelado y almacenado a -40°C, se picó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en forma finamente desmenuzada y se sumergió en acetona, y el cartílago nasal se deshidrató y desengrasó. Se usaron como material de partida 24,00 g del cartílago nasal tratado, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida. A un recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 2.997,75 g de agua destilada, que previamente había sido enfriada a 5°C, y se añadieron a esto además 2,25 g de hidróxido de sodio sólido para preparar 3.000,00 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,02 N). A este recipiente de extracción se le añadió el material de partida más arriba descrito (24,00 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba su contenido con un dispositivo agitador.

35 Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, por encima del que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm), de manera tal que se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

40 El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmcCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

45 Se tomó una fracción del material concentrado obtenido de esta manera y se usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 24,00 g del material de partida se habían obtenido 7,50 g de un material sólido secado, que corresponden a un 30,29 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

50 Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer, fabricado por Hitachi Ltd.) con el fin de

cuantificar la cantidad de colágeno que está contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

- 5 Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 11,8 % de proteínas, 18,4 % de un contenido de cenizas, 67,8 % de hidratos de carbono y 0,0 % de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 91,1 % (es decir, (hidratos de carbono x 0,07 + lípidos) / (hidratos de carbono + proteínas + lípidos) x 100 = 91,1 %). Se encontró además que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 1.200.000 Dalton.

<Ejemplo 3>

- 15 Un cartílago nasal extraído de una parte de la cabeza de un salmón *Oncorhynchus keta*, que había sido congelado y almacenado a -40°C, se picó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en forma finamente desmenuzada y se sumergió en acetona, y el cartílago nasal se deshidrató y desengrasó. Se usaron como material de partida 17,90 g del cartílago nasal tratado, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida. A un recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 2.322,67 g de agua destilada, que previamente había sido enfriada a 5°C, y se añadieron a esto además 2,33 g de hidróxido de potasio sólido para preparar 2.325 g en total de una solución acuosa de hidróxido de potasio (0,018 N). A este recipiente de extracción se le añadió el material de partida más arriba descrito (17,90 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba el contenido con un dispositivo agitador.

Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, sobre el que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm) de manera tal que el cartílago nasal se eliminó y se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

- 25 El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmcCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

- 30 Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

- 35 Se tomó una fracción del material concentrado obtenido de esta manera y se usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción del material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 17,90 g del material de partida se habían obtenido 5,29 g de un material sólido secado, que corresponde a 29,61 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

- 40 Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer, fabricado por Hitachi Ltd.) con el fin de cuantificar la cantidad de colágeno que está contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

- 45 Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 14,0 % de proteínas, 22,4 % de un contenido de cenizas, 63,6 % de hidratos de carbono y 0,0% de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 87,7 % (es decir, (hidratos de carbono x 0,07 + lípidos) / (hidratos de carbono + proteínas + lípidos) x 100 = 87,7 %). Se encontró además que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 1.200.000 Dalton.

<Ejemplo 4>

- 50 Un cartílago extraído de la carina (cresta) de un pollo desde el que se había retirado manualmente la carne se cortó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en una forma desmenuzada y se sumergió en acetona, y el cartílago de la carina (cresta) del pollo se deshidrató y desengrasó. Se usaron como material de partida 44,40 g del cartílago tratado, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida. A un

5 recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 2.997,75 g de agua destilada, que previamente se había enfriado a 5°C y se añadieron a esto además 2,25 g de hidróxido de sodio sólido para preparar 3.000,00 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,02 N). A este recipiente de extracción, se le añadió el material de partida más arriba descrito (44,40 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba el contenido con un dispositivo agitador.

Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, sobre el que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm) de manera tal que el cartílago se eliminó y se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

10 El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmacCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

15 Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

20 Se tomó una fracción del material concentrado obtenido de esta manera y se usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 44,40 g del material de partida se habían obtenido 9,87 g de un material sólido secado, que corresponden a 22,23 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

25 Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (Amino Acid Analyzer L-8500, fabricado por Hitachi Ltd,) con el fin de cuantificar la cantidad de colágeno que está contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

30 Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 31,3 % de proteínas, 16,9 % de un contenido de cenizas, 51,8 % de hidratos de carbono y 0,0 % de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 66,7 % (es decir, $(\text{hidratos de carbono} \times 0,07 + \text{lípidos}) / (\text{hidratos de carbono} + \text{proteínas} + \text{lípidos}) \times 100 = 66,7 \%$). Además, se encontró que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 920.000 Dalton (16 %) y de aproximadamente 460.000 Dalton (84 %).

35 <Ejemplo 5>

40 Un cartílago que había sido extraído manualmente de una raya (*Dipturus kwangtungensis*) se cortó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en una forma desmenuzada y se sumergió en acetona, y el cartílago se deshidrató y desengrasó. Se usaron como material de partida 12,00 g del cartílago tratado, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida. A un recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 1.678,74 g de agua destilada, que previamente había sido enfriada a 5°C, y se añadieron a esto además 1,26 g de hidróxido de sodio sólido con el fin de preparar 1.680,00 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,02 N). A este recipiente de extracción, se le añadió el material de partida más arriba descrito (12,00 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba el contenido con un dispositivo agitador.

45 Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, sobre el que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm) de manera tal que el cartílago se eliminó y se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmacCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

50 Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

Se tomó una fracción del material concentrado obtenido de esta manera y se usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 12,00 g del material de partida se habían obtenido 2,15 g de un material sólido secado, que corresponden a 17,92 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer fabricado por Hitachi co. Ltd.) para cuantificar la cantidad de colágeno que estaba contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 43,5 % de proteínas, 19,5 % de un contenido de cenizas, 37,0 % de hidratos de carbono y 0,0 % de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 49,2 % (es decir, (hidratos de carbono x 0,07 + lípidos) / (hidratos de carbono + proteínas + lípidos) x 100 = 49,2 %). Además, se encontró que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 1.700.000 Dalton.

<Ejemplo 6>

Un cartílago que había sido extraído manualmente de un tiburón se cortó usando una picadora eléctrica de carne para formar diminutos trozos en una forma finamente desmenuzada y se sumergió en acetona, y el cartílago se deshidrató y desengrasó. Se usaron como material de partida 12,00 g del cartílago tratado, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida. A un recipiente de extracción con una capacidad de 5 litros se le añadieron 1.678,74 g de agua destilada, que previamente se había enfriado a 5°C y se añadieron a esto además 1,26 g de hidróxido de sodio sólido para preparar 1.680,00 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,02 N). A este recipiente de extracción se le añadió el material de partida más arriba descrito (12,00 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba el contenido con un dispositivo agitador.

Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, sobre el que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm) de manera tal que el cartílago se eliminó y se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmacCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

Una fracción del material concentrado obtenido de esta manera se tomó y usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró a partir de 12,00 g del material de partida se habían obtenido 1,36 g de un material sólido secado, que corresponde a 11,36 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

Además, se determinó la cantidad de aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer, fabricado por Hitachi co. Ltd.) para cuantificar la cantidad de colágeno que estaba contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 37,8 % de proteínas, 27,4 % de un contenido de cenizas, 37,8 % de hidratos de carbono y 0,0 % de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 55,7 % (es

decir, $(\text{hidratos de carbono} \times 0,07 + \text{lípidos}) / (\text{hidratos de carbono} + \text{proteínas} + \text{lípidos}) \times 100 = 55,7 \%$). Además, se encontró que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 1.500.000 Dalton.

<Ejemplo 7>

5 La piel externa de un calamar se peló manualmente y se sumergió en acetona, y se deshidrató y desengrasó. La piel externa tratada, después de haber secado en aire o de haber secado bajo presión reducida, se usó como material de partida. Después de haber cortado la piel en finos trozos con unas tijeras y de haberla triturado luego usando un mortero, se preparó la piel externa secada del calamar. A un recipiente de extracción con una capacidad de 10 litros se le añadieron 5.036,20 g de agua destilada, que previamente se había enfriado a 5°C y se añadieron a esto además 3,80 g de hidróxido de sodio sólido para preparar 5.040 g en total de una solución acuosa de hidróxido de sodio (0,02 N). A este recipiente de extracción, se le añadió la piel externa secada más arriba descrita (33,70 g) y se sumergió durante 9 horas mientras que se agitaba el contenido con un dispositivo agitador.

Al haberse completado la inmersión, el contenido se transfirió a otro recipiente, sobre el que se había colocado un filtro de acero inoxidable (de 1 mm) de manera tal que el cartílago se eliminó y se pudo recuperar un extracto que incluía un proteoglicano.

15 El extracto se sometió a una centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm usando una centrifugadora (de Hitachi, tipo hmacCF7D2). Como resultado, las porciones sólidas y oleosas se eliminaron y se recuperó una fase líquida que incluía un proteoglicano.

20 Luego, la fase líquida se filtró a través de un papel de filtro (fabricado por Advantec) seguido por una adición de agua destilada con un volumen seis veces mayor que el del material filtrado. Subsiguientemente, usando una membrana de poliétersulfona BIOMAX 100K POLYETHERSULFONE (peso molecular de corte 100.000 Dalton, fabricada por Millipore, Japón), los procesos de separación con corte y de concentración se llevaron a cabo al mismo tiempo.

25 Una fracción del material concentrado obtenido de esta manera se tomó y usó para determinar el peso de material sólido en el líquido. Con un horno de desecación (YAMATO DX401), la fracción de material concentrado se secó a 105°C durante 16 horas con el fin de evaporar completamente la humedad. Una medición fina del material sólido remanente se llevó a cabo usando una máquina pesadora digital (GF-400 fabricada por A&D Corp.). Como resultado, se encontró que a partir de 33,70 g del material de partida se habían obtenido 16,10 g de un material sólido secado, que corresponden a 47,7 % del material de partida como valor del porcentaje de conversión.

30 Además, se determinó la cantidad de un aminoácidos ensayando el material concentrado por uso de un aparato automático analizador de aminoácidos (L-8500 Amino Acid Analyzer fabricado por Hitachi co. Ltd.) para cuantificar la cantidad de colágeno que estaba contenida en el material concentrado. Por lo demás, siguiendo el método de Galambos, se determinó la cantidad de ácido urónico con el fin de calcular la cantidad de proteoglicano. Todavía más, usando una cromatografía de fase líquida de alta velocidad (columna TSK-GEL G4000PWXL, fabricada por Shimadzu Corporation), se determinó el peso molecular del proteoglicano.

35 Como resultado de estos análisis, se encontró que el material sólido incluye 91,7 % de proteínas, 1,9 % de un contenido de cenizas, 6,4 % de hidratos de carbono y 0,0 % de lípidos. De acuerdo con la descripción del Documento de Patente 1, la relación ponderal de la proteína de núcleo en el proteoglicano es de aproximadamente 7,0 %. Por lo tanto, se calculó que la pureza presumida del proteoglicano del presente invento es de 7,0 % (es decir, $(\text{hidratos de carbono} \times 0,07 + \text{lípidos}) / (\text{hidratos de carbono} + \text{proteínas} + \text{lípidos}) \times 100 = 7,0 \%$). Además, se encontró que el peso molecular del proteoglicano es de aproximadamente 1.700.000 Dalton.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para producir un proteoglicano, que comprende las etapas de:
sumergir una muestra biológica que contiene un proteoglicano que está presente en la forma de un compuesto complejo con una proteína y cadenas de condroitina o de sulfato de condroitina, en una solución alcalina desde 0,01 N hasta 0,05 N a 0°C hasta 10°C, y recuperar la solución alcalina que incluye dicho proteoglicano obtenido a la terminación de la inmersión, después de que los materiales residuales hayan sido eliminados desde el extracto.
2. El procedimiento para producir un proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de separar el proteoglicano desde la solución recuperada.
- 10 3. El procedimiento para producir un proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2. en el que la solución alcalina es una solución de una sal de un metal alcalino.
4. El procedimiento para producir un proteoglicano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en el que la muestra biológica que contiene un proteoglicano es un tejido de cartílago, fibrillas musculares o cuero de un pez, molusco, ave o mamífero.
- 15 5. El procedimiento para producir un proteoglicano de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la muestra biológica que contiene un proteoglicano es un tejido de cartílago de un pez, ave o mamífero.

Fig. 1

