

335206 -3 ENE



335206

memoria descriptiva

CLASE DE
REGISTRO

una PATENTE DE ADICION

NOMBRE Y
NACIONA-
LIDAD DEL
SOLICITANTE

THE UPJOHN COMPANY
(sociedad norteamericana)

RESIDENCIA
Y DOMICILIO

Kalamazoo. Michigan (U.S.A.)
301. Henrietta Street.

OBJETO

Mejoras en la patente principal nº 311.597, con-
cedida por:
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE UNA PROTEINA DE GLANDULA DE HIPOFISIS DE CERDO".

PRIORIDAD:

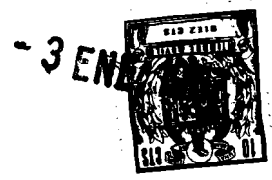
Patente americana, Serial Nº 522.401 del
24 de Enero de 1966.

=====



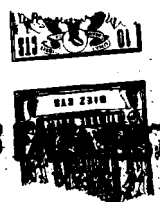
Esta invención se refiere a un proceso para preparar factor lactogénico de las glándulas pituitarias del cerdo, más particularmente a un proceso en el cual dicho factor lactogénico se aplica a y se eluye del intercambiador aniónico dietilaminoetil celulosa.

5 La cromatografía con dietilaminoetil celulosa del factor lactogénico de glándulas pituitarias del cerdo da un pico principal de elución de forma casi simétrica. Sin embargo, el factor lactogénico en tal pico principal de elución manifiesta microheterogeneidad en gel electroforesis. En una base de gel acrilamida, Peacock et al, Science 147: 1451 (1965), todos los materiales se desplazan hacia el anodo separándose en una cantidad de bandas de proteínas (cinco o más). Se observan ~~varias~~ bandas muy pequeñas además de tres bandas prominentes. La Banda prominente No.1 comprende un componente principal generalmente asociado con una pequeña cantidad de una proteína ligeramente más móvil, formando un doblete; la segunda banda prominente es un doblete de alta concentración de un componente precedida por una concentración un tanto menor de un componente ligeramente más móvil; la banda prominente No.3 no se ha resuelto en más de un componente. Las tres bandas prominentes están numeradas desde el punto de origen, siendo 10 la No.3 la de mayor movilidad. Siempre que el material preparado por el procedimiento de dietilaminoetil celulosa 15 se somete a recromatografía, no se obtiene posterior resolución; las líneas ascendentes y descendentes del pico simétrico del eluido muestran el mismo trazado de proteínas en gel electroforesis. 20



Se ha encontrado ahora que una técnica modificada de aplicar el factor lactogénico a la dietilaminoetil celulosa da por resultado la separación de los varios componentes anteriormente mencionados, puesto que ellos cambian en concentración de una manera gradual en el eluido a partir de la dietilaminoetil celulosa. La técnica exacta de elusión puede variar, según lo que sea más satisfactorio para un determinado material de partida y los resultados deseados. Esencialmente, el factor lactogénico se aplica a la dietilaminoetil celulosa en una cantidad suficiente para saturar la dietilaminoetil celulosa antes de que comience la elución. Generalmente, uno puede cerciorarse de que el factor lactogénico aplicado para saturar la dietilaminoetil celulosa es suficiente por el aspecto de la proteína y por la absorbancia aumentada a 280 mμ en el eluido, tan pronto se ha recogido el volumen máximo necesario de la cantidad en cuestión de dietilaminoetil celulosa.

En el caso de una dietilaminoetil celulosa que tiene 0.9 ± 0.1 miliequivalentes por Gm. (Selectacel) y cargada en una columna a 9 lbs. de presión, se aplica suficiente factor lactogénico para proporcionar una relación de 1 Gm a aproximadamente de 20 ml. a aproximadamente 70 ml. de volumen de lecho, preferentemente 1 Gm. a aproximadamente 23 ml. En el caso de Sephadex A-50 es satisfactorio dejar asentar por gravedad (aproximadamente 2.8 miliequivalentes por Gm.). Aplicando la cantidad suficiente anteriormente mencionada de factor lactogénico a la dietilaminoetil celulosa da por resultado las condiciones siguientes. En lugar de simple elución cromatográfica, en donde la fuerza iónica de eluyente preferentemente eluye ciertos componentes, según sean su pKa y otros factores, la cromato-



5 graffa de desplazamiento también tiene lugar a continuación, en donde los componentes que tienen mayor afinidad con la dietilaminoetil celulosa desplazan aquellos de menor afinidad, en una palabra, empujándolos más hacia abajo de la columna. Es esta combinación de los principios de elución la que conduce a una mayor selectividad y resolución cromatográfica, como podrá apreciarse aquí más adelante.

10 La zona de pH del eluyente varía de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 y la fuerza iónica varía de aproximadamente 0.01 μ a aproximadamente 0.5 μ . El tris buffer, tris (hidroximetil)aminometano, ajustado con ácido, o el amortiguador bicarbonato-carbonato pueden utilizarse, preferentemente el amortiguador ácido tris-clorhídrico de pH de aproximadamente 8.2. Generalmente, un pH por debajo de aproximadamente 8.0 debe evitarse debido a la absorbilidad disminuida del factor lactogénico y los valores pH mayores deben evitarse debido a una posible inactivación del factor lactogénico proteiniforme.

20 Como se usa en la presente, dietilaminoetil celulosa significa dietilaminoetil celulosa (capacidad de aproximadamente 0.9 miliequivalentes por Gm.) o un equivalente tal como un dextran gel de ligaduras cruzadas conteniendo grupos dietilaminoetilo (Sephadex A-50, capacidad aproximada de 2.8 miliequivalentes por gramo. Pharmacia Fine Chemicals, Inc.).

25 Como es conocido por aquellos expertos en la materia, el factor lactogénico puede obtenerse de glándulas hipófisis porcinas frescas, de glándulas hipófisis de porcino desecadas por acetona y glándulas hipófisis de porcino secadas por congelación. La extracción de tales glándulas hipófisis con agua acidificada, ácido acético glacial, ácido acético al



40% en metanol, o solvente similar da extractos impuros. Otros mate-
riales biológicamente activos en los extractos, por ejemplo, la hormona
adrenocorticotrópica, pueden separarse por absorción de los mismos en
polvo de oxixelulosa, por ejemplo a partir de solución de ácido acético
5 diluido. Luego el pH de la solución de ácido acético diluido es aumen-
tado hasta aproximadamente 10.5, disminuido hasta pH de aproximadamente
7 con hidróxido de sodio y cualquier material soluble se filtra o centri-
fuga para suministrar una solución del factor lactogénico. Un material
lactogénico seco puede prepararse convenientemente a partir del filtrado
10 de ácido acético después de separar la hormona adrenocorticotrópica sobre
oxixelulosa ajustando el pH dentro de la zona de 7 a 8, por filtración de
esta solución y separación de cualquier material insoluble y precipita-
ción del factor lactogénico del filtrado límpido agregando suficiente
cantidad de etanol para llevar a una continuación de aproximadamente
15 42.5%. El precipitado se dializa a 4°C. y se liofiliza para dar un polvo
soluble. Alternativamente, una solución acuosa de pH 8 del precipitado
alcohólico puede precipitarse iso-eléctricamente a pH de aproximadamente
4.95, y el precipitado puede dializarse a 4°C. y liofilizarse para dar
un factor lactogénico de partida para solución en el tris buffer. Aún
20 puede obtenerse otra preparación de material de partida adecuado precipi-
tando directamente una prolactina activa a pH 4.95 a partir de una solu-
ción de ácido acético 0.1 N de la misma para obtener un precipitado iso-
eléctrico, que se redisuelve a pH aprox. 8 y se reprecipita isoeléctricamente
a pH 4.95. Luego el precipitado se dializa a 4°C y se liofiliza. De la
25 misma manera es adecuada para solución en el tris buffer una fracción de

335206

= 3E



212

factor lactogénico retardada obtenida por pasaje a través de Sephadex G-75. Como es conocido por aquellos expertos en la materia, el factor lactogénico de porcino es útil para mantener la lactación en conejos y ratas que se usan con fines de procreación y para aumentar la capacidad de empollar de las gallinas.

5

Los ejemplos siguientes exponen como realizar el proceso de la invención y el mejor modo proyectado para llevar a cabo la invención, pero no deben interpretarse como una limitación de la misma.

Ejemplo 1

10

Se obtuvieron cincuenta y cinco Gms. de factor lactogénico impuro a partir del precipitado alcohólico de ácido acético 0.1 N de la preparación de hormona adrenocorticotrópica, precipitando dos veces isoelectricamente a pH 4.95 de una solución de pH 8. Los 55 Gms. se disolvieron en 550 ml. de tris buffer, 0.01 μ . La solución se aplicó a una columna de dietilaminoetil celulosa de 48 mm. x 72 cm. La técnica de elución es como se describe a continuación. Se recogieron volúmenes de tubo de aproximadamente 18 ml.

15

μ	Elución Vol. (ml.)	Intercambio (Tubo No.)
0.01	3500	--
20 0.01 → 0.05**	1300 cada uno	140
0.5 → 0.1**	500 cada uno	278*
0.1	2400	314
0.5	4100	447
1.0	4400	1101
25 N/10 NaOH	5300	



335206

2121

* En el tubo 314 los 375 ml. restantes de este gradiente se descartaron y la elución comenzó con amortiguador 0.1 μ.

** Gradientes lineales.

5 Se realizaron cortes como se indica más abajo, la prolactina precipitó por ajuste de pH a 4.95, luego se dializó y liofilizó.

	<u>Fraccion</u>	<u>Tubos</u>	<u>Peso (Gm.)</u>	<u>Actividad (U/mg.)</u>
	130.1			
	130.2	398 - 560	22.2	13.6*
	130.3	561-588	1.0	11.0
10	130.4	589-615	0.7	10.0
	130.5	616-670	1.0	18.0
	130.6	671-694	0.3	11.0
	130.7	695-780	0.8	14.0
	130.7a	781-965	1.4	13.0
15	130.8	966-999	5.5	11.0
	130.9	1000-1018	0.3	5.0
	130.10	1019-1065	0.5	4.0
	130.11	1066-1193	0.6	7.0
	130.12	1194-1225	0.08	7.0
20	130.13	1226-1394	0.4	7.0
	130.14	1395-1496	0.4	6.0
	130.15	1549-1603	2.4	1.0
	130.16	1604-1715	1.6	3.0

25 *Ensayo duplicado de 3 niveles. Los otros son ensayos de nivel simple y solamente útiles para una actividad general relativa. Así hasta la fracción 8 la actividad es probadamente alta; más allá de 8 la actividad es probablemente muy baja.



Los gel electroferogramas demostraron que la fracción 130.2 era una prolactina porcina equivalente a aquella aislada en los picos principales de elución de ml cromatografía anterior. Las fracciones .3 a .7 (aproximadamente 5 Gms.) fueron aproximadamente idénticas entre sí pero diferentes de la fracción .2 por haber sido casi eliminadas de la banda No. 1 y por tener más bien una banda prominente justo antes de la banda No.3. Las fracciones 8 y siguientes dieron trazados muy indefinidos por gel electroferogramas, y probablemente representaban material desnaturalizado.

10 Ejemplo 2

La columna usada en Ejemplo 1 fué regenerada. La carga fué 52 Gms. de factor lactogénico impuro, obtenido a partir de procedimientos para aislación de ACTH (filtrado de ácido acético 0.01 N) por clarificación a pH 8 y precipitación isoelectrica directa a pH 4.95, siendo el precipitado isoelectrico dializado a 4°C y liofilizado. Cincuenta y dos Gms. de este material liofilizado se disolvió en 550 ml de tris buffer (0.01 μ). En este caso el trazado de elución cambio a un gradiente discontinuo. Sin embargo, el volumen recolectado por tubo fué aproximadamente 18 ml. como anteriormente. El trazado de elución fué como sigue:

	<u>μ</u>	<u>Vol. (ml.)</u>	<u>Cambio Tubo</u>
20	0.01	3600	95
	0.05	9700	516
	0.1	7800	957
	0.5	6360	1313
25	1.0	3040	1485
	N/10 NaCH	5600	



335206

En el tubo 131, debido a un mal funcionamiento del aparato de recolección, se recogieron 1650 ml. de efluente como única fracción. Todas las proteínas se recolectaron por precipitación a pH 4.95. Se disminuyó el pH del sobrenadante hasta pH 3.5 y se llevó a 4% con NaCl. Esto precipita material adicional y no deja prolactina en solución. Los precipitados a pH 4.95 son designados como P, el precipitado adicional a pH 3.5 con sal es SP.

5

10

15

20

25

<u>Fracción</u>	<u>Tubos</u>	<u>P (Gm.)</u>	<u>SP (Gm.)</u>
133.1	132-175		0.08
133.2	176-282	9.05	0.33
133.3	283-417	2.7	0.43
133.4	418-495	1.5	0.12
133.5	496-601	0.83	0.24
133.6	602-745	9.0	0.34
133.7	746-855	2.1	0.65
133.8	856-880	0.41	
133.9	881-929	0.29	0.15
133.10	930-948	0.18	
133.11	949-1046	0.37	0.16
133.12	1047-1108	7.53	5.1
133.13	1109-1210	0.38	0.24
133.14	1211-1390	0.24	0.13
133.15	1663-1686	0.61	
133.16	1687-1720	0.94	
133.17	1721-1787	0.35	



5 Los electroferogramas demostraron que la fracción .2P comprendía principalmente el compuesto menos móvil de banda No.1, con algo del componente más móvil de banda No.1, y menores cantidades de banda No.2, segunda banda prominente. La fracción .2SP fué similar, pero predominaba el componente más móvil de la banda prominente No.1. La fracción .3P fué aproximadamente una mezcla a partes iguales de las bandas No. 1 y No.2. Las fracciones .4P y .5P predominaban en la banda No.2. La fracción .6P predominaba en el doblete No.2 y banda 3. La fracción .7 tenía una cantidad sustancial de banda No.3 pero predominaba una banda adicional más móvil. Las fracciones .8 y .9 fueron principalmente dos bandas de una naturaleza más móvil que los Nos. 1, 2 y 3. Las fracciones .12P y .12SP no son prolactinas.

Ejemplo 3

15 Se disolvió 1.75 Gm. de fracción 130.2 de Ejemplo 1 en un total de 30 ml. de tris buffer de 0.01 μ ajustando el pH a 9.5 con hidróxido de sodio 1 N y reajustando hasta pH 8.2 con ácido clorhídrico 1 N. Se obtuvo una solución límpida por centrifugación. La solución se aplicó a una columna de dietilaminoetil celulosa (11 mm. x 40 cm.) que había sido previamente equilibrada con tris buffer, pH 8.2 y 0.01 μ . La carga se llevó 20 a cabo a una presión de 9 libras. Se recolectaron volúmenes en tubo de aproximadamente 5 ml. a una velocidad de flujo de aproximadamente 50 ml. por hora. El procedimiento de elución con tris buffer de diferentes fuerzas iónicas fué como sigue:



5

<u>μ</u>	<u>Vol. (ml.)</u>	<u>Cambio Tubo</u>
0.01	1050	200
0.01 → 0.3*	500 cada una	389
0.03	1050	580
0.03 → 0.05*	400 cada una	725
0.05	800	725
0.05 → 0.1*	200 cada una	949
Tris + 4M NaCl	320	

*Gradientes lineales

10

Se realizaron cortes de eluidos que luego se dializaron en tuberías de celofan a 4°C y se secaron por congelación. Se examinó una muestra de cada material secado por congelación en acrilamida gel al 5%.



335206

Fración	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
De	10	17	28	220	266	311	326	341	371	384	391	396	406
Tubos	A	16	27	45	285	310	325	340	370	383	395	405	440
Peso (mg.)	209	2	3	34	46	43	35	70	36	22	24	30	73

Electro-ferograma

Bandas

A	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
B	mD	mD	D	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C	mD	D	F	M	D	mD	--	--	--	--	--	--	--
1a	F	D	M	mF	mF	mF	M	M	M	M	D	D	D
1b	D	--	D	M	M-F	M	D	D	D	D	mD	--	--
2a	M	mD	mD	D	D	M	D	F	F	F	F	F	F
2b	F	mD	mD	D	D	M	D	M	M-F	M-F	F	F	F
3	D	--	--	--	--	--	--	D	D	D	D	D	D
D	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
E	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Las bandas principales se designan por los Nos. 1-3 indicados los debidos por mb-letras
similares que las bandas menores se designan por letras solamente.

Símbolos M = muy M = moderado
D = débil F = fuerte

Freción	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	130.2
De	441	472	511	591	651	701	739	797	879	901	916	929		
Tubos	4	471	510	550	700	738	796	878	900	915	928	958		
Peso (mg.)	47	43	63	56	67	80	79	48	88	76	25	26		

Electrofe-
rograma

Bandas

A	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
B	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
C	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	mD
1a	D-M	D-H	D-N	mD	--	--	--	--	--	--	--	--	--	F
1b	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	D
2a	mF	mF	mF	mF	mF	D	mD	mD	D	--	--	--	--	mF
2b	F	mF	mF	mF	mF	D	mD	mD	F	--	--	--	--	F
3	M	M	M-F	F	mF	mF	mF	mF	M	D	D	D	D	F
D	--	--	--	--	D	D	D	D-H	H	D-H	D	D	D	D-H
E	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	D

Impreciso

Las bandas principales se designan por los Nos. 1-3 con los doblesos indicados por sub-letras mientras que las bandas menores se designan por letras solamente.

Símbolos
 m = muy fuerte
 D = Débil
 M = Moderado
 F = fuerte
 H = Grazas
 Subrayado = extremadamente fuerte

335206

- 3 EN 2121



335206



Ejemplo 4

Esta separación fué similar a aquella en Ejemplo 3, con excepción de que se aplicó 1.75 Gm. del factor lactogénico en urea 4M a una columna perfectamente lavada con urea. La columna era de 11 mm. por 40 cm. y se lavó a 49°C. El trazado de elución fué similar a aquel de Ejemplo 3, con excepción de que en la urea 4M se aumentó la elución proteínica con un eluyente 0.01M. Los gel electroferogramas mostraron una separación similar a aquella en Ejemplo 3.

N O T A .-
 = = = = =

La presente patente de adición, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Mejoras en la patente principal nº 311.597, concedida por: Procedimiento para la preparación de una proteína de glándula de hipófisis de cerdo, caracterizadas por que para preparar factor lactogénico de glándulas de hipófisis de porcino, en donde se aplica una solución acuosa de dicho factor a un eluido de dietilaminoetil celulosa, (1) se aplica a la dietilaminoetil celulosa una cantidad sufi-

- 3 ENE.
2121



335206

5 ciente de factor lactogénico de glándula de hipófisis de porcino para saturar la dietilaminoetil celulosa, y (2) se eluye dicho factor de la dietilaminoetil celulosa con un buffer tri-ácido acuoso o amortiguador carbonato-bicarbonato que tiene un pH de desde aproximadamente 8 a aproximada
mente 10 y una fuerza iónica de aproximadamente 0.01 u a aproximadamente 0.5 μ .

10 2.- Mejoras en la patente principal nº 311.597, concedida por: Procedimiento para la preparación de una proteína de glándula de hipófisis de cerdo.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, la cual consta de quince hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

- 3 ENE. 1967

CARLOS ROEM