

406976



P.- 51.999

Hoe 71/B 016 K

Int. Cl.² C 07G 11 A 61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

F. C. 28-5-75

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

con domicilio en MARBURG/LAHN, República Federal Alemana.

por: "PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE UNA NUEVA

β_1 -GLICOPROTEINA ESPECIFICA PARA EL EMBARAZO"

(Clase Internacional C12K)

406976



Hasta ahora no se sabía que en la placenta y en la orina de embarazadas existe una β_1 -glicoproteína específica para el embarazo. Desde luego, ya se ha detectado inmunológicamente una proteína en el margen β del suero de embarazadas, pero todavía no se ha descrito ningún procedimiento para el aislamiento de ésta.

Objeto del invento es un procedimiento para el aislamiento de la β -glicoproteína específica para el embarazo (expresado de modo abreviado SP_1), que está caracterizado porque la β_1 -glicoproteína específica para el embarazo es aislada de la placenta así como de la sangre u orina de embarazadas mediante fraccionamiento de acuerdo con métodos usuales. Otro objeto más del invento es la β_1 -glicoproteína específica para el embarazo que está caracterizada por

una velocidad de desplazamiento electroforético en el gel de agar dentro del margen de las β_1 -globulinas, una constante de sedimentación de $4,6 S \pm 0,55$ un peso molecular de aproximadamente $100.000 \pm$

15.000

un coeficiente de extinción $E_1^1 \%_{cm} = 11,0 \pm 0,5$ (278 $m\mu$; tampón de fosfato 1/15 molar pH 7,0)

un contenido de carbohidratos de 26,5-29,6%, de los cuales son 10,0 - 11,0 % de hexosas, 9,5 - 10,5 % de hexosamina, 0,5 - 0,6 % de fucosa y 6,5 - 7,5% de ácido neurámico.

21.9.72.

-2-

406976



La β_1 -glicoproteína específica para el embarazo preparada de acuerdo con el invento sirve para la obtención de antisueros. Con éstos, a su vez, mediante métodos inmunológicos (ensayo de inhibición de la hemaglutinación, reacción de fijación de complemento, ensayo de radio-inmunización, aglutinante de látex) puede detectarse un embarazo. La detección se puede efectuar con suero o con orina de las embarazadas. Una determinación cuantitativa de SP_1 , por ejemplo con la inmunodifusión radial, puede ser importante para efectuar una vigilancia del embarazo.

Para la preparación de la β_1 -glicoproteína específica para el embarazo se someten placentas desmenuzadas a extracción con una solución salina poco concentrada y las proteínas susceptibles de ser precipitadas con lactato de diaminoetoxiacridina son separadas con un valor de pH de aproximadamente 8,0. La SP_1 que queda en la porción sobrenadante es precipitada conjuntamente con gamma-globulinas mediante sulfato de amonio. Para la separación de la SP_1 desde la cantidad principal de la gamma-globulina, el precipitado disuelto de nuevo en agua pura, convenientemente después de un tratamiento previo por diálisis frente a una solución tampón, es sometido a adsorción en dietilaminoetil (DEAE)-celulosa y es eluido de nuevo desde ésta. Como agente eluyente se ha acreditado

14.9.72.

-3-

406976

23 54



una solución tampón 0,02-molar de tris-oximetilaminometilo y ácido clorhídrico de valor de pH 6,5, que además puede contener aproximadamente 0,85% de cloruro de sodio y una pequeña cantidad, por ejemplo 0,05 %, de azida de sodio.

5 La precipitación del eluato con sulfato de amonio proporciona la SP₁ en forma concentrada o enriquecida, que puede ser purificada adicionalmente por filtración en gel, por ejemplo mediante Sephadex[®] G-150.

10 Para la purificación adicional es apropiada la electroforé^sis preparativa en zonas con poli(cloruro de vinilo) como soporte en una solución tampón apropiada, por ejemplo bicarbonato de amonio al 0,075%. Después de la separación electroforética la zona del soporte que con^utiene SP₁ es recortada, eluida con bicarbonato de amonio
15 y liofilizada. Otros procedimientos apropiados de purificación en alto grado son una cromatografía sobre DEAE-Sephadex con subsiguiente elución con un gradiente de clo^ruro de sodio, y un fraccionamiento con alcohol, preferi^blemente con etanol. La β ₁-glicoproteína específica para
20 el embarazo es aislada de manera similar a partir de san^gre o de orina de embarazadas

Ejemplo 1. Aislamiento desde placentas.

150 kg de placentas intensamente congeladas son desmenuzados y sometidos a extracción con 150 litros de
25 una solución acuosa al 0,5% de cloruro de sodio. El extra^c

14.9.72.

406976



to es ajustado a pH 8 con hidróxido de sodio 2 N y es mez-
clado con 50 litros de una solución acuosa al 3% de lacta-
to de diaminoetoxiacridina (Rivanol[®]). Después de un tiem-
5 po de espera de 1 hora, la porción sobrenadante, que con-
tiene la SP₁ juntamente con gamma-globulina, es retirada
con sifón, es mezclada con 5% de cloruro de sodio sólido
(11 kg) para la separación del Rivanol que todavía queda
en disolución, es filtrado y mezclado con 26,5 %, referido
10 al peso del líquido, de sulfato de amonio sólido, y es bien
agitado a fondo. Después de 1 hora el precipitado es sepa-
rado por filtración.

500 g del precipitado recogido sobre el filtro
son disueltos en 500 ml de agua destilada y son dializados
frente a una solución tampón 0,01 molar de tris-(oximetil)-
15 -aminometano (abreviado en lo que sigue con la expresión
"tris") - ácido clorhídrico de valor de pH 7,0, que con-
tiene 0,05 % de azida de sodio. La solución dializada es
centrifugada y la porción sobrenadante es completada hasta
2000 ml con la misma solución tampón, es ajustada a pH 8,0
20 con solución 0,1 N de hidróxido de sodio y es agitada du-
rante una hora con 250 g de DEAE- celulosa húmeda.

Luego la DEAE-celulosa es separada de la solu-
ción mediante filtración, es lavada dos veces cada vez con
1 litro de tampón 0,01 molar de tris y ácido clorhídri-
25 co de valor de pH 8,0, y después de ello es eluida tres



406976

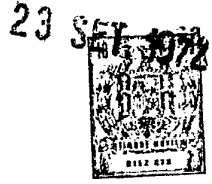
veces cada vez en 500 ml de tampón 0,02 molar de "tris-"
ácido clorhídrico, pH 6,5, que contiene 0,85% de cloruro
de sodio y 0,05 % de acida de sodio. A los eluatos reuni-
dos se añade 30% de sulfato de amonio, referido al peso
5 del líquido, y se agita el conjunto . El precipitado, que
contiene la SP₁, es disuelto en 300 ml de agua destilada
y es sometido a filtración en gel mediante Sephadex G-150
con utilización de tampón 0,1 molar de "tris y ácido clor-
hídrico de pH 8,0, que contiene 1,0 moles de cloruro de
10 sodio por litro (columna de 100 : 20 cm).

A continuación los eluatos son ensayados con an-
tisero específico de SP₁, las fracciones que contienen
SP₁ son recogidos y a partir de ellas se precipitan las
proteínas nuevamente, tal como se describe anteriormente,
15 con 30% de sulfato de amonio sólido.

Se logra una purificación adicional mediante
electroferesis preparativa en zonas con poli(cloruro de
vinilo) (PCV) como soporte. En calidad de tampón se utili-
za una solución 0,075 molar de bicarbonato de amonio
20 pH 8,0). Después de la separación por electroforésis se
recorta la zona β que contiene SP₁, se eluye con el tam-
pón de bicarbonato de amonio y se liofilizan los eluatos.

La sustancia seca es disuelta en tampón 0,01
molar de "tris" y ácido clorhídrico de pH 7,0, que contie-
25 ne 0,2% de cloruro de sodio, es cromatografiada sobre

406976



DEAE-Sephadex (columna de 5 x 20 cm) y es eluida con un gra
diente lineal de 0,2 hasta 2,0% de cloruro de sodio en tam
pón 0,01 molar de "tris" y ácido clorhídrico, de pH 7,0.
5 Sigue a continuación una precipitación con 40% de etanol
a -5°C. Después de separar por centrifugación el precipita
do, la porción sobrenadante es dializada frente a agua des
tilada hasta quedar libre de sal y es liofilizada. Grado
de pureza 90-95%. Este preparado puede encontrar utiliza
ción para la preparación de antisueros.

10 Ejemplo 2: Aislamiento desde sangre.

5 litros de suero de embarazadas son diluidos con
agua destilada en la proporción 1:1 y a partir de esto se
precipita la cantidad principal de las proteínas del plas
ma mediante 2,5 litros de Rivanol al 3% a pH 8,0. La por
15 ción sobrenadante obtenida por centrifugación es mezclada
con 5% de cloruro de sodio para la eliminación del Rivanol.
El precipitado que resulta de este modo es separado por cen
trifugación, la porción sobrenadante es separada del sedi
mento y mezclada con 30% de sulfato de amonio sólido. En
20 el precipitado están contenidas la gamma globulina y la
 β_1 -glicoproteína específica para el embarazo. El precipi
tado es disuelto en tampón 0,01 molar de "tris" y ácido
clorhídrico de pH 7,0, es dializado frente a tampón 0,01
molar de "tris" y ácido clorhídrico de pH 7,0, y a conti
25 nuación es purificado con DEAE-celulosa. El tratamiento

406976



con DEAE-celulosa se lleva a cabo en tampón 0,01 molar de "tris" y ácido clorhídrico de pH 8,0.

5 La elución desde DEAE-celulosa, la filtración en gel con Sephadex, la electroforesis preparativa en zonas, la purificación sobre DEAE-Sephadex, así como la precipitación con alcohol se realizan tal como se describe en el Ejemplo 1.

10 Esta solicitud, que corresponde a las presentadas en la República Federal Alemana, el 29 de Septiembre de 1.971, N^o P 21 48 587.0, y el 20 de Noviembre de 1.971, N^o P 21 57 610.3, se acoge a los beneficios del art^o 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

- REIVINDICACIONES -

20

25 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años,

31-3-75

406976



son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª.- Procedimiento para el aislamiento de una nueva β_1 -glicoproteína específica para el embarazo, caracterizado porque de un extracto obtenido a partir de placentas con ayuda de una solución salina o de sangre u orina de ambarazadas se separan las proteínas precipitables con lactato de diaminoetoxiacridina, a continuación se precipita, en particular por medio de sulfato de amonio, la β_1 -glicoproteína específica para el embarazo que queda en la porción sobrenadante junto con gammaglobulina y se separa de esta última la β_1 -glicoproteína por cromatografía y/o electroforesis.

15 2ª.- Procedimiento para el aislamiento de una nueva β_1 -glicoproteína específica para el embarazo.

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

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

Madrid,

- 1 ABR. 1975

P.A.

Alberto de Lin...
For Forer