

24



414021

414021

P.- 54.159

Hoe 72/B 007

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar

F.E. 10-11-75

CO7G

PATENTE DE INVENCION

en ESPAÑA

Por VEINTE años

A nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LA β_1 -GLICOPROTEINA-
-FA (Fase Aguda) Y LA α_2 -GLICOPROTEINA-FA"

(Clase Internacional CO7g)

414021

24



Objeto del invento son glicoproteínas-FA y un procedimiento para el aislamiento de éstas.

Ya se ha propuesto un procedimiento para el --
aislamiento de una β_1 -glicoproteína específica del emba-
5 razzo. En esta propuesta, no obstante, no se hizo mención
a que durante el embarazo aparecen otras dos glicoproteí-
nas, las cuales, no obstante, no son específicas del em-
barazo, ya que aparecen también en el suero de pacientes
que tienen enfermedades de diversos orígenes. A causa de
10 esta aparición tanto en el embarazo como en el caso de -
enfermedades son denominadas glicoproteínas-FA (FA = Fa-
se Aguda).

Se ha encontrado que se pueden aislar estas --
dos glicoproteínas-FA a partir de placentas o de la san-
15 gre de mujeres embarazadas.

Por lo tanto, son objeto del invento las dos -
glicoproteínas.

La β_1 -glicoproteína-FA, caracterizada por una
velocidad de desplazamiento electroforético en el gel de
20 agar dentro del margen de las β_1 -globulinas y por un pe-
so molecular de aproximadamente 100.000 (\pm 10%), y la --
 α_2 -glicoproteína-FA, caracterizada por una velocidad de
desplazamiento electroforético en el gel de agar dentro
del margen de las α_2 -glicoproteínas y un peso molecular
25 de aproximadamente 300.000 (\pm 10%).

414021



5 El hecho de que las glicoproteínas-FA tienen -
un mayor contenido de carbohidratos se deduce de la modi-
ficación de su movilidad electroforética en el tratamien-
to con neuraminidasa. Después de la separación del ácido
neurámico la β_1 -glicoproteína-FA muestra la movilidad de
una gamma-globulina, y la α_2 -glicoproteína-FA muestra la
movilidad de una β_1 -globulina.

10 Un desplazamiento tan intenso lo muestran en -
general sólo plasmaproteínas que contienen al menos 2-6%
de ácido neurámico o 10-30% de carbohidratos.

15 La velocidad de desplazamiento en un gel de -
poliacrilamida (con 5,5% de acrilamida a pH 8,5 en el --
tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano-citrato-borato,
Z. clin. Chem. 4, 58 (1966)) es de 62 para la β_1 -glico-
proteína-FA y de 32 para la α_2 -glicoproteína-FA, si se
establece con un valor de 100 la velocidad de desplaza-
miento de la albúmina humana.

20 Es objeto del invento además un procedimiento
para el aislamiento de estas dos glicoproteínas-FA, el -
cual está caracterizado porque se fraccionan de acuerdo
con métodos de por sí conocidos placentas o sangre de mu-
jeres embarazadas.

25 Para el aislamiento de las glicoproteínas-FA,
placentas desmenuzadas pueden ser sometidas a extracción
con una solución de sal débil fisiológicamente compati-

414021



ble, por ejemplo de cloruro sódico. A partir del extracto se puede separar un precipitado previo inactivo con lactato de diaminoetoxiacridina a un pH débilmente ácido, y a continuación en un margen de pH alcalino precipitar las dos glicoproteínas de nuevo mediante precipitación con lactato de diaminoetoxiacridina. Para la separación del precipitado previo, el lactato de diaminoetoxiacridina es aconsejado preferiblemente en forma de solución acuosa en una cantidad de 5 a 10% en peso, calculado con respecto al contenido proteínico del extracto. Para la precipitación principal, que convenientemente tiene lugar en un margen de pH entre 7,5 y 9,0, se aconseja una cantidad de lactato de diaminoetoxiacridina de 10 a 30%, -- calculado con respecto al contenido proteínico del extracto. Para la purificación ulterior es apropiada la filtración a través de gel con dextrano reticulado, por ejemplo Sephadex G-150 y/o la electroforesis en zonas preparativa.

La filtración a través de gel se lleva a cabo después de diálisis frente a una solución tampón débil, por ejemplo 0,01 molar, de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido clorhídrico con un pH de 7,5 a 8,5 preferiblemente de pH 8,0, en dextrano reticulado tal como Sephadex G-150. Para la elución puede servir por ejemplo tampón 0,1 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido



414021

clorhídrico, el cual contiene además 1 mol por litro de cloruro de sodio. En este proceso de elución se eluye en primer término la α_2 -glicoproteína-FA, mientras que la β_1 -glicoproteína-FA sale sólo más tarde de la columna. La α_2 -glicoproteína-FA es eluida inmediatamente después de la α_2 -macroglobulina y la β_1 -glicoproteína-FA es eluida inmediatamente después de la 7S-gamma-globulina.

Ambas proteínas son precipitadas mediante sulfato amónico (aproximadamente 2-2,5 moles por litro). Después de la disolución de ambos precipitados en agua destilada las soluciones son dializadas frente a una solución tampón tal como bicarbonato de amonio de pH 8,0 a 8,5 y son separadas convenientemente de modo adicional con el mismo tampón en la electroforesis en zonas preparativa. Las correspondientes zonas en el margen α_2 o en el margen β_1 son eluidas con bicarbonato de amonio y se cadas por congelación.

Para el aislamiento de las dos glicoproteínas-FA desde el suero, los productos del procedimiento son precipitados en el margen de pH alcalino (pH 8-9) con lactato de diaminoetoxiacridina a partir de suero retroplacentario. El complejo con acridina es mezclado con solución de cloruro de sodio, por ejemplo con una solución al 4-6%, preferiblemente al 5%, el precipitado resultante



24

414021

es separado y desechado, y la porción sobrenadante es -- precipitada con sulfato de amonio sólido (2-2,5 moles/litro).

5 Para la separación de las dos glicoproteínas-FA se puede utilizar también en este caso la filtración a través de gel, siendo eluida la α_2 -glicoproteína-FA después de la α_2 -macroglobulina, y siendo eluida la β_1 -glicoproteína-FA después de la 7S-gammaglobulina. A continuación, - tal y como ya se ha descrito en el caso del aislamiento desde placenta -, se realiza una electroforesis en zonas preparativa. Los pesos moleculares son determinados por su comportamiento en el caso de la filtración a través de gel.

10 Las glicoproteínas-FA aisladas de acuerdo con el invento sirven para la obtención de antisueros. Con éstos, a su vez, se puede determinar el estado de una enfermedad y vigilar el transcurso de enfermedades por medio de métodos inmunológicos (ensayo de difusión a través de gel, electroforesis de desplazamiento superior, - determinación radioinmunológica).

15 La detección inmunológica de las glicoproteínas-FA es importante para la diagnóstico diferencial, dado que en diferentes enfermedades existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la aparición de estas proteínas. Además de ello, su determinación inmunológica puede

414021



ser utilizada para la vigilancia de la terapia. La detección se lleva a cabo con suero del paciente.

Ejemplo 1.

Aislamiento a partir de suero retroplacentario.

5 500 ml de suero retroplacentario son diluidos con 500 ml de agua destilada y son precipitados a pH 8,5 (solución 0,1 N de cloruro de sodio) con 350 ml de una solución al 3% de lactato de diaminoetoxiacridina. El precipitado es separado por centrifugación y mezclado --
10 con 500 ml de solución al 5% de cloruro de sodio, precipitando el derivado de acridina. El derivado de acridina separado es centrifugado, la porción sobrenadante es precipitada por adición de 30 g de sulfato de amonio sólido por 100 ml. El precipitado obtenido contiene las dos glicoproteínas-FA. Estas, después de disolver en agua, son
15 separadas por filtración a través de gel en Sephadex G-150 en fracciones cada una de 20 ml (columna 10 x 100 cm). Para la elución sirve tampón 0,1 molar de tris-(hidroximetil)-aminometano y ácido clorhídrico de pH 8,0, que --
20 contiene además 1,0 moles/litro de cloruro de sodio. Las fracciones son ensayadas con antisueros específicos de conejos (ensayo de difusión a través de gel de acuerdo con Ochterony).

25 Las correspondientes fracciones, en las que se detectaron los dos productos del procedimiento, son en -



414021

5 cada caso reunidas, precipitadas con 30 g de sulfato de amonio por 100 ml de solución, dializadas frente a solución 0,075 molar de bicarbonato de amonio y separadas -- por electroforesis preparativa para la ulterior purificación. Para ello se hace uso del poli(cloruro de vinilo) como soporte y de una solución al 0,075 % de bicarbonato de amonio como tampón.

10 Las glicoproteínas-FA son eluidas con el mismo tampón desde las correspondientes zonas, es decir el margen ξ_1 y el margen α_2 de las globulinas, y los eluatos son liofilizados a continuación. En la electroforesis -- preparativa la α_2 -glicoproteína-FA se encuentra en la fracción α_2 y la ξ_1 -glicoproteína-FA se encuentra en la fracción ξ_1 .

15 Ejemplo 2.

Aislamiento desde placentas.

20 10 kg de placentas humanas son desmenuzados en estado congelado a baja temperatura y son extraídos con 10 litros de una solución al 0,5 % de cloruro de sodio - (durante 1 hora a 5-10°C). 10 litros de la solución de - extracción son ajustados a pH 6,0 con ácido acético al - 20% y mezclados en primer término con 1500 ml de una solución al 3% de lactato de diaminoetoxiacridina. El precipitado previo inactivo es separado por centrifugación
25 y desechado. La porción sobrenadante es ajustada a pH 8,5

414021

24



con solución 2 N de hidróxido de sodio y es precipitada con 3 litros de la solución al 3% de sal de acridina. El precipitado, que contiene las glicoproteínas-FA, es descompuesto con 6 litros de una solución al 5% de cloruro de sodio de modo correspondiente al Ejemplo 1. Después de centrifugación se agrega a la porción sobrenadante 30% de sulfato de amonio sólido. El precipitado, que se obtiene mediante filtración, es disuelto en agua y dializado frente a una solución 0,01 molar de tris-(hidroximetil)-amino-

5

10

15

20

cometano y ácido clorhídrico (pH 6,0). Para la eliminación de gamma-globulina y hemoproteínas, la solución es mezclada con agitación con 150 g de carboximetilcelulosa húmeda y a continuación es filtrada. A partir de filtrado se aislan las glicoproteínas-FA mediante precipitación con sulfato de amonio (al 30% en peso/volumen). El precipitado es disuelto en agua, y desdoblado y purificado de acuerdo con el Ejemplo 1 mediante filtración a través de gel y electroforesis en zonas preparativa. El rendimiento es de 15 mg de la β_1 -glicoproteína-FA y de 5 mg de la α_2 -glicoproteína-FA.

25

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el 29 de Abril de 1972, bajo el N° P 22 21 261.9, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

414021



- 1 SET. 1975

- REIVINDICACIONES -

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para el aislamiento de la β_1 -glicoproteína-FA (Fase Aguda) y la α_2 -glicoproteína-FA, teniendo la primera una velocidad de desplazamiento electroforético en el gel de agar en el margen de las β_1 -globulinas y un peso molecular de aproximadamente 100.000, y la segunda una velocidad de desplazamiento electroforético en el gel de agar en el margen de la α_2 -glicoproteínas y un peso molecular de aproximadamente 300.000, caracterizado porque se somete a fraccionamiento a placentas o sangre de mujeres embarazadas según métodos de por sí conocidos.

15

20

2ª.- Procedimiento para el aislamiento de las glicoproteínas-FA de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque placentas desmenuzadas se someten a extracción con una solución de sal fisiológicamente compatible, desde el extracto se separa con lactato de diaminoetoxiacridina, a un

25



414021

-198



valor de pH débilmente ácido, un precipitado previo inactivo, y a continuación, en el margen de pH alcalino, se precipitan las dos glicoproteínas con lactado de diaminoetoxiacridina.

5 3^a.- Procedimiento para el aislamiento de las glicoproteínas-FA de acuerdo con la reivindicación 1^a, caracterizado porque se mezcla suero retroplacentario, en el margen de pH alcalino, con lactato de diaminoetoxiacridina, se separa el precipitado, se recogen en solución de cloruro de sodio, se separa el material no disuelto y se mezcla con sulfato de amonio sólido.

10

4^a.- Procedimiento para el aislamiento de la β_1 -glicoproteína-FA (Fase Aguda) y la α_2 -glicoproteína-FA.

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

15 Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 1 SET. 1975

P.A.

Alberto de Elcavero

Por escrito